

AUTOKATALYSIERTE
AFFINITÄTSMARKIERUNG
DNA-ABHÄNGIGER
RNA POLYMERASEN

Anton Rudolf Schäffner

Disbui. München

1988

**AUTOKATALYSIERTE AFFINITÄTSMARKIERUNG
DNA-ABHÄNGIGER RNA POLYMERASEN**

**Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

von

Anton Rudolf Schöffner

aus

Feldkirchen

1988

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 12,3 der Promotionsordnung vom 5. März 1981 von Prof. Dr. G.R. Hartmann betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfen angefertigt.

München, am 12. Januar 1988

Anton Schäfer

Dissertation eingereicht am: 12. Januar 1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G.R. Hartmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E.L. Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Februar 1988

Diese Arbeit entstand von Oktober 1984 bis Dezember 1987 im Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. G.R. Hartmann. Bei ihm bedanke ich mich für seine zahl- und lehrreichen Anregungen zur Arbeit und zur Formung meines wissenschaftlichen Denkens. Auch wären ohne seine weitreichenden Kontakte viele Experimente und Erfahrungen nicht möglich gewesen.

Für die interessante Zusammenarbeit, besonders aber für die mehr als gastliche, herzliche Aufnahme, so daß ich mich trotz jeweils kurzen Zeit wohl fühlen konnte und Freunde gewann, freue ich mich, hier meinen Dank an

Arkady Mustaev, Geny Zaychikov und Michail Grachev am Institut Bioorganitseskoje Khimii, Novosibirsk, auf deren Vermittlung der Technik der Affinitätsmarkierung und besonders der Herstellung der Nukleotidderivate alle weiteren Untersuchungen beruhen Michel Riva und André Sentenac am Centre d'Etudes Nucléaires, Saclay

Lucia Rothman-Denes, Klara Abrevaya, Sandra Glucksmann und George Schneider an der University of Chicago, Chicago und Bill McAllister an der State University of New York, Brooklyn ausdrücken zu können.

Heidi Sieber danke ich für das Anfertigen der Negative der abgebildeten Autoradiographien

Prof. Dr. M. Zenk am Institut für Pharmazeutische Biologie hat mir die Benutzung seiner Laboreinrichtungen zu Pflanzenzellkultur erlaubt, Brigitte Deus hat mir dort mit großer Geduld über die anfänglichen Schwierigkeiten hinweggeholfen.

P. Zambryski und K. Geider danke ich für die Überlassung von Plasmiden, L. Willmitzer und H. Steinbiß für Tabaksuspensionskulturen und für Hinweise zu deren Propagation.

Stephan Glaser hat im Rahmen seiner Diplomarbeit einige Fragestellung bearbeitet, die in diese Arbeit aufgenommen wurden. Für die gute Zusammenarbeit, zahlreiche Diskussionen und für sein großes Engagement bedanke ich mich herzlich.

Schließlich gilt mein besonderer Dank allen *Madams* und *Sirs* vom Keller bis zum zweiten Stock für die gute und entspannte Atmosphäre in unserem Institut und für zahlreiche große und kleine Diskussionen, Hinweise und Hilfen, ohne die diese Arbeit ein tristes und schwieriges Unterfangen geblieben wäre.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Verzeichnis der Tabellen und Figuren	vi
Abkürzungsverzeichnis	viii
EINLEITUNG	1
MATERIAL	11
1. CHEMIKALIEN	11
2. CHROMATOGRAPHIE	12
3. GERÄTE	12
4. NUKLEOTIDE UND NUKLEINSÄUREN	13
5. ENZYME	13
6. BAKTERIEN UND PFLANZENMATERIAL	14
METHODEN	15
1. ENZYMATISCHE REAKTIONEN AN NUKLEINSÄUREN UND NUKLEOTIDEN	15
1.1. Restriktionsverdauung von DNA	15
1.2. Auffüllen des Gegenstranges an 5'-überhängenden DNA-Enden	15
1.3. 5'-Phosphorylierung von 5'-OH-DNA	15
1.4. Ligierung von DNA-Fragmenten	15
1.5. Dephosphorylierung	16
1.6. Nuklease-Verdauung von DNA, RNA oder Ribonukleotiden	16
2. PLASMIDE	17
2.1. Klone und Subklone	17
2.2. Anreicherung	19
3. ANREICHERUNG DER RNA POLYMERASE II AUS WEIZENKEIMEN	21

4.	TABAKZELLKULTUR	21
4.1.	Suspensionskultur	23
4.2.	Callus-Kultur	23
4.3.	Zellkernisolierung	24
4.4.	Aufschluß der Zellkerne	27
5.	SYNTHESE DER ADENOSIN- UND GUANOSINDERIVATE	28
5.1.	Triethylammoniumsalz von ATP und GTP	28
5.2.	Adenosin- und Guanosintrimetaphosphat : ATmP und GTmP	29
5.3.	p- oder o-Hydroxybenzaldehydester von ATP und GTP : pHB-ATP, oHB-ATP, pHB-GTP und oHB-GTP	30
5.4.	Aminobenzaldehydester von AMP, ADP, ATP, GMP, GDP, GTP : AB-AMP, AB-ADP, AB-ATP, AB-GMP, AB-GDP, AB-GTP	33
6.	TRENNMETHODEN	38
6.1.	Gelelektrophoresen	38
6.1.1.	25% Polyacrylamid-Sequenzgel	38
6.1.2.	SDS-Polyacrylamidgele	38
6.1.3.	Agarose-Gele	40
6.2.	Dünnschichtchromatographie	40
6.2.1.	Silicagel 60 F254	41
6.2.2.	Whatman 3MM	41
6.2.3.	PEI-Cellulose F254	41
6.3.	Elution aus Gelen	42
6.3.1.	Elektroelution von Polypeptiden aus SDS-Polyacryl- amidgelen	42
6.3.2.	Elektroelution von DNA-Fragmenten	43
6.3.3.	Elution nach Dünnschichtchromatographie	44
7.	NACHWEISE UND DOKUMENTATION	44
7.1.	Proteine	44
7.1.1.	Proteinfärbung in SDS-Polyacrylamidgelen	44
7.1.2.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	46
7.2.	Nukleotide und Nukleinsäuren	47
7.3.	Radioaktivität	47
7.3.1.	Autoradiographie	47
7.3.2.	Quantitative Bestimmung	48

8.	AKTIVITÄTSTEST FÜR RNA POLYMERASE	48
9.	ANSÄTZE ZUR ABORTIVEN INITIATION	50
10.	RADIOAKTIVE VERGLEICHsverbindungen	51
10.1.	[³² P]A*pU	51
10.2.	[³² P]ApU*pA	51
10.3.	[³² P]A*pU*pU	52
10.4.	[³² P]poly[r(A,U)]-Nukleotidleiter (2-40 Nukleotide)	52
11.	ANSÄTZE ZUR AFFINITÄTSMARKIERUNG	56
11.1.	Analytische Ansätze	56
11.1.1.	Inkubation mit dem (Aldehyd-)Derivat	56
11.1.2.	NaBH ₄ -Reduktion	57
11.1.3.	Bildung von Phosphodiesterbindungen mit [α - ³² P]NTP	57
11.1.4.	Abbrechen der Reaktion, anschließende Verdauung und Denaturierung	58
11.1.5.	Variationen	58
11.1.6.	Kontrollkriterien für eine funktionelle Affinitätsmarkierung	59
11.2.	Präparative Ansätze	59
11.3.	Abspaltung der 5'-gebundenen Oligonukleotide	62
12.	PROTEOLYSE	63
12.1.	Verdauungen mit Proteinase K und Pronase	63
12.2.	Verdauung mit Trypsin	63
12.3.	Verdauung mit Chymotrypsin	64
13.	PUFFER	64

ERGEBNISSE

65

1.	ABORTIVE INITIATION	65
1.1.	Abortive Initiation der Weizenkeim RNA Polymerase II	66
1.1.1.	Abortive Initiation mit AMP oder ATP und $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$	66
1.1.2.	Produktcharakterisierung	72
1.2.	Abortive Initiation der Hefe RNA Polymerase II	76
2.	AFFINITÄTSMARKIERUNG	79
2.1.	Weizenkeim RNA Polymerase II	79
2.1.1.	Spezifische Markierung der 140k-Untereinheit (W140)	79
2.1.2.	Komplementarität der Markierung zu Zweiersequenzen der DNA	82
2.1.3.	Phosphodiesterbindungen an der markierten Polymerase-Untereinheit W140	85
2.1.3.1.	Nachweis von ApU	86
2.1.3.2.	Nachweis von ApApU, ApUpA und ApUpU	91
2.1.4.	Radioaktive Spaltprodukte nach Proteolyse von *W140	100
2.1.4.1.	Intensive Verdauung mit Trypsin	100
2.1.4.2.	Partielle Proteolyse	105
2.1.5.	Untersuchungen der zur Markierung führenden Reaktionsschritte	107
2.1.5.1.	Umsetzung mit den Aldehyd-Derivaten	107
	- Kinetik der Reaktion mit AB-ADP	107
	- Konzentration der Aldehyd-Derivate	108
	- Einflüsse von Aminogruppen und des pH	113
2.1.5.2.	Einfluß der NaBH_4 -Reduktion	115
2.1.5.3.	Einfluß der DNA-Matrize	116
2.1.5.4.	Einfluß von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$	119
2.1.5.5.	Einflüsse zusätzlicher, nicht-radioaktiver Nukleotide	119
2.1.6.	Spezifische Markierung von W140 in nur teilweise gereinigtem Extrakt	122
2.2.	Kernextrakt aus Tabakzellen	126
2.2.1.	Solubilisierung von RNA Polymerase-Aktivität	126
2.2.2.	Spezifische Markierung der zweitgrößten RNA Polymerase-Untereinheit	128

2.3.	Hefe RNA Polymerasen I, II und III	131
2.3.1.	Hefe RNA Polymerase II	131
2.3.1.1.	Spezifische Markierung der zweitgrößten Untereinheit mit Mr 150k (B150)	131
2.3.1.2.	Nachweis von Phosphodiesterbindungen am markierten B150	133
2.3.2.	Hefe RNA Polymerasen I und III	140
2.4.	<i>Anabaena</i> RNA Polymerase	144
2.5.	<i>E. coli</i> Bakteriophagen RNA Polymerasen	147
2.5.1.	Polymerasen des Coliphagen N4	147
2.5.1.1.	N4 Virion RNA Polymerase	148
2.5.1.2.	N4 RNA Polymerase II	151
2.5.2.	T7 und T3 RNA Polymerasen	153
2.5.2.1.	Affinitätsmarkierung der T7 und T3 RNA Polymerasen	154
2.5.2.2.	Promotorabhängigkeit der Affinitätsmarkierung der T7 RNA Polymerase	156
3.	BINDUNG DES 5'-ENDES VON RNA AN WEIZENKEIM RNA POLYMERASE	163
3.1.	Spezifische Markierung der beiden größten Polymerase-Untereinheiten	164
3.2.	Heterogene RNA-Ketten an W220 und W140	166
	DISKUSSION	175
	ZUSAMMENFASSUNG	186
	ANHANG	188
1.	Regionale Selektivität der abortiven Dinukleotid-Synthese von Weizenkeim RNA Polymerase II	188
2.	Substrateigenschaften der Aldehyd-Nukleotidderivat-Präparationen	197
	LITERATUR	199



VERZEICHNIS DER FIGUREN UND TABELLEN

	Seite
Fig. 1 Trennung von Oligoribonukleotiden der Reihen pppA(pN) _x und A(pN) _x mit N = A,U und x ≥ 1 in einem 25% Sequenzgel	54
Fig. 2 Gelelektrophoretische Analyse der abortiven Ini- tiation mit Adenosinphosphaten und [α - ³² P]NTP ohne Behandlung mit alkalischer Phosphatase	68
Fig. 3 Gelelektrophoretische Analyse der abortiven Ini- tiation mit Adenosinphosphaten und [α - ³² P]NTP nach Verdauung mit alkalischer Phosphatase	68
Fig. 4 Chromatographische Analyse der abortiven Initiation mit Adenosinphosphaten und [α - ³² P]NTP nach Verdauung mit alkalischer Phosphatase	71
Fig. 5 pppApU-Synthese durch RNA Polymerase II aus <i>S. cerevisiae</i>	77
Fig. 6 Gelelektrophoretische Analyse der Affinitätsmar- kierung von Weizenkeim RNA Polymerase II	81
Fig. 7 Abhängigkeit der Affinitätsmarkierung von Sequenzen auf der DNA	84
Fig. 8 Gelelektrophoretische Auftrennung nach Spaltung des markierten *W140 mit Pyrophosphatase und alkalischer Phosphatase	88
Fig. 9 Chromatographische Auftrennung nach Spaltung des markierten *W140 mit Pyrophosphatase und alkali- scher Phosphatase	89
Fig. 10 Rechromatographie und enzymatische Spaltung der Affinitätsmarkierungsprodukte ApU-, ApApU- und ApUpU	92
Fig. 11 Chromatographische Analysen nach Proteolyse der markierten Untereinheit *W140	102
Fig. 12 Affinitätsmarkierung in teilweise gereinigtem Extrakt aus Weizenkeimen	123
Fig. 13 Gelelektrophoretische Analyse der Affinitätsmarkie- rung in einem rohen Kernextrakt aus Tabakzellen	129
Fig. 14 Gelelektrophoretische Analyse der Affinitätsmarkie- rung der RNA Polymerase II aus Hefe	132
Fig. 15 Gelelektrophoretische Auftrennung nach Spaltung von *B150 mit Pyrophosphatase und Phosphatase	134
Fig. 16 Chromatographische Analyse nach Spaltung von *B150 mit Pyrophosphatase und Phosphatase	135
Fig. 17 Rechromatographie und enzymatische Spaltung der ApU- und ApApU-Gipfel	138

Fig. 18	Gelelektrophoretische Analyse der Affinitätsmarkierung der Hefe RNA Polymerasen I und III	142
Fig. 19	Gelelektrophoretische Analyse der Affinitätsmarkierung der <i>Anabaena</i> RNA Polymerase	145
Fig. 20	Gelelektrophoretische Analyse der Affinitätsmarkierung der N4 Virion RNA Polymerase	149
Fig. 21	Gelelektrophoretische Analyse der Affinitätsmarkierung der N4 RNA Polymerase II Aktivität	152
Fig. 22	Gelelektrophoretische Analyse der Affinitätsmarkierung der T7 und T3 RNA Polymerasen	160
Fig. 23	Promotor-gesteuerte Spezifität der Affinitätsmarkierung	160
Fig. 24	Gelelektrophoretische Analyse der Markierung von W220, W180 und W140 bei Reduktion nach der RNA-Synthese	165
Fig. 25	Eluierte, markierte Untereinheiten Gelelektrophorese und chromatographische Analyse nach Verdauung mit RNase T2	167
Fig. 26	Gelelektrophoretische Analyse von enzymatischen Verdauungen der markierten *W220, *W220R, *W140 und *W140R	170
Fig. 27	Verwandte Sequenzbereiche von RNA Polymerasen	183
Fig. 28	Restriktionskarte des <i>Hind</i> III-Fragments 23 aus pTiC58 zur Erzeugung der verwendeten Subfragmente	195
Tab. 1	Charakteristische Daten der Nukleotidderivate	37
Tab. 2	Reaktionsbedingungen zur Affinitätsmarkierung von RNA Polymerasen (Analytische Ansätze)	60
Tab. 3	Zusammenstellung und Klassifizierung der Produkte bei der abortiven Initiation am Plasmid <i>ple</i>	74
Tab. 4	Affinitätsmarkierung in Abhängigkeit von der Reaktionszeit mit AB-ADP	107
Tab. 5	Abhängigkeit der Markierung von W140 und der Aktivität der RNA Polymerase von der Konzentration von AB-ADP, pHB-ATP oder Pyridoxal-5'-Phosphat	110
Tab. 6	Abhängigkeit der Affinitätsmarkierung von der DNA-Zugabe	117
Tab. 7	Abhängigkeit der Markierung von W140 von der UTP-Konzentration und dessen spezifischer Radioaktivität	120
Tab. 8	Solubilisierung von RNA Polymerase-Aktivität aus Tabakkernen	127
Tab. 9	Matrizenaktivitäten und Sequenzdaten verschiedener Bereiche des Nopalindehydrogenase-Gens	190
Tab. 10	poly[d(A-T)]-abhängige Enzymaktivität der Weizenkeim RNA Polymerase II in Gegenwart von [α - 32 P]UTP und Adenosin-Derivaten	197

ABKÜRZUNGEN

(A,U)	ApU oder UpA
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
Ipm	Radioaktive Impulse pro Minute
kbp	10 ³ Basenpaare
NTmP	Nukleosidtrimetaphosphat
O.D.	Optische Dichte
*p	[³² P] Phosphatgruppe
R _{AU}	auf ApU bezogener relativer Laufwert
R _F	auf die angegebene Verbindung oder die Fließ- mittelfront bezogener relativer Laufwert
TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/w	Volumenanteil / Volumenanteil
w/v	Massenanteil / Volumenanteil
*	mit [³² P] markierte Substanz (* vorgestellt)
	Untereinheiten der Weizenkeim RNA Polymerase II
W140	mit Mr 140000
W180	mit Mr 180000
W220	mit Mr 220000
	Untereinheiten der Hefe RNA Polymerasen
A135	I (A) mit Mr 135000
B150	II (B) mit Mr 150000
C128	III (C) mit Mr 128000
pHB-	4-Hydroxybenzaldehyd-Ester von
oHB-	2-Hydroxybenzaldehyd-Ester von
AB-	4-[N-(2'-Hydroxyethyl),N-methyl]amino- benzaldehyd-Ester von

E I N L E I T U N G

RNA Polymerasen nehmen eine Schlüsselposition beim Zugriff auf die in Nukleinsäuren durch die Abfolge der Nukleotide gespeicherte Information ein. Unterschieden nach ihrer genauen Funktion und ihrer Herkunft aus verschiedenen Organismen hat man eine große Vielzahl dieser Enzyme gefunden, die aber alle prinzipiell ähnliche Aufgaben ausführen müssen (Lewis & Burgess, 1982; Ryan & Chamberlin, 1982; Sentenac, 1985; Zillig *et al.*, 1985) :

Die Matrizenerkennung und -bindung, im Fall von doppelsträngiger DNA oder RNA vermutlich auch deren Entwindung, die Bindung von Nukleosidtriphosphaten als Substrate, die mit möglichst hoher Genauigkeit komplementär und in umgekehrter Polarität zum kodierenden Matrizenstrang über 5',3'-Phosphodiesterbindungen verknüpft werden, und die Bindung von Teilen des Produkts, da es wiederum Substrat der nächsten Polymerisationsreaktion ist. Um eine schrittweise Transkription zu erreichen, sollte auch ein gleichgeschalteter Transportmechanismus für die Matrize und die gebildete RNA existieren. Diese grundlegende Modellvorstellung wird schließlich noch weiter verfeinert, um die Promotor- und Terminationspezifität und das unterschiedliche Ausmaß verschiedener Transkripte zu erklären.

Als aktives Zentrum einer RNA Polymerase wird der Bereich definiert, in dem die Katalyse von 5',3'-Phosphodiesterbindungen zwischen dem 3'-Hydroxyl-Ende des initiiierenden Nukleotids bzw. der wachsenden RNA-Kette und dem nächsten Nukleosidtriphosphat erfolgt und dieser Prozeß gleichzeitig durch den Vergleich mit der kodierenden Matrizensequenz kontrolliert wird.

Die Aufklärung von Beziehungen zwischen der Struktur dieser komplexen Systeme und ihrer Funktionen stellt eines der Hauptprobleme zum Verständnis der Transkription und ihrer Regulation dar. Dazu wurde eine Reihe verschiedener Ansätze verfolgt.

Durch Dissoziation in verschiedene Komponenten konnte man im Fall

von prokaryotischen Enzymen Teilfunktionen zuordnen (Kessler *et al.*, 1982).

Kinetische Untersuchungen zur katalysierten Reaktion, auch in Gegenwart von Hemmstoffen, ergaben indirekte Einblicke in Reaktionswege, Teilschritte und deren strukturelle Beeinflussungen (Ruet *et al.*, 1980; Hartmann *et al.*, 1985). Aufschlußreich waren auch genetische Studien mit Polymerase-Mutanten, die in bestimmten Eigenschaften verändert waren (Ruet *et al.*, 1980; Greenleaf, 1983; Litsyn *et al.*, 1984). Immunologische Kreuzreaktionen (Buhler *et al.*, 1980; Huet *et al.*, 1982a, 1985; Weeks *et al.*, 1982; Sentenac, 1985) oder schließlich die Sequenzierung von RNA Polymerase Genen (Ovchinnikov *et al.*, 1981; Allison *et al.*, 1985; Biggs *et al.*, 1985; Sweetser *et al.*, 1987; Falkenburg *et al.*, 1987; Nonet *et al.*, 1987) führten zur Entdeckung verwandter Strukturen und lassen eine Extrapolation aufgeklärter Struktur-Funktionsbeziehungen auf andere Systeme zu. Äußerst interessant sind auch Studien mit monoklonalen Antikörpern mit deren Hilfe eine Beteiligung der gebundenen Struktur an bestimmten Prozessen in Betracht gezogen oder ausgeschlossen werden kann (Dahmus & Keding, 1983; Carroll & Stollar, 1983).

Den direktesten Weg zur Aufklärung von Struktur-Funktionsbeziehungen stellen aber die Affinitätsmarkierungen dar, besonders angesichts des derzeitigen Fehlens von Röntgen- oder NMR-Strukturuntersuchungen an RNA Polymerasen. Das Enzym wird dazu mit Substraten, Inhibitoren, Matrizen oder Produkten oder mit chemisch reaktiven Analoga davon (z.B. mit SH-, CHO-, alkylierenden oder photoreaktiven Gruppen), auch in Konkurrenz mit natürlichen Reaktionspartnern, inkubiert und diese direkt oder mit Hilfe dritter Reagentien an die Polymerase gebunden. Die Bindungsstellen werden anschließend nach Dissoziation oder Proteolyse der modifizierten Enzyme nachgewiesen. Auf diese Weise konnte die DNA-Bindung mit den beiden größten Untereinheiten verknüpft werden (Skiba *et al.*, 1986; Gundelfinger, 1983). Die α -Amanitin-Bindung wurde der zweitgrößten Untereinheit der Kalbsthymus RNA Polymerase II zugeordnet (Brodner & Wieland, 1976); eine α -Amanitin resistente Form der

Drosophila RNA Polymerase II war dagegen in der größten Untereinheit mutiert (Greenleaf, 1983). Die zweitgrößte und in manchen Untersuchungen auch die größte Untereinheit des *E. coli* Enzyms oder der RNA Polymerase I aus Hefe und der Polymerase II aus Weizenkeimen wurden als Nukleotidbindungsstelle(n) bestimmt (Nixon *et al.*, 1972; Valenzuela *et al.*, 1978; Cho & Kimball, 1982; Cho *et al.*, 1982; Bateman & Nicholson, 1984b).

Da diese Schlußfolgerungen aber auf der Inaktivierung der Enzymaktivität durch das entsprechende Analogon beruhen, ist eine Hauptschwierigkeit bei diese Untersuchungen, daß nie eindeutig eine spezifische, der natürlichen Situation entsprechende Bindung von einer unspezifischen, lediglich aufgrund der chemischen Modifizierung erfolgten Bindung unterschieden werden kann. Dies trifft besonders auf die zum Teil nur entfernt strukturähnlichen Nukleotidanaloga zu. Außerdem wird durch die Affinitätsmarkierung nur eine Situation erfaßt und der Rückschluß auf die Funktion ist nicht eindeutig, eine spezifische Nukleotidbindung könnte etwa im aktiven Zentrum oder an einem regulatorischen Bereich erfolgt sein.

Johnston und McClure (1976) beschrieben für die *E. coli* RNA Polymerase eine Reaktion, die abortive Initiation, die es erlaubt die Initiation der RNA Synthese¹ zu amplifizieren und von der nachfolgenden Elongation zu entkoppeln, wobei katalytisch in Gegenwart von zwei Nukleotiden nur die erste Phosphodiesterbindung geknüpft wird².

¹Unter dem Begriff Initiation werden alle Prozesse subsumiert, die zur Bildung der ersten Phosphodiesterbindung führen.

²Falls diese Reaktion mit zwei Nukleosidtriphosphaten durchgeführt wird, spricht man von einer *primer*-unabhängigen abortiven Initiation, da beide Reaktionspartner prinzipiell als erstes oder als zweites Substrat verwendet werden können. Andererseits nennt man die abortive Initiation *primer*-abhängig, wenn ein Substrat auf die Rolle als Startnukleotid beschränkt ist, also z.B. bei modifizierten Nukleotiden (z.B. NAD⁺), 5'-AMP oder auch Dinukleosidmonophosphaten (z.B. UpA). Die Reaktion eines Dinukleosidmonophosphats mit einem Nukleosidtriphosphat wird auch abortive Elongation genannt, da in diesem Fall die zweite Phosphodiesterbindung des Produkts gebildet wird.

Die abortive Initiation der *E. coli* Polymerase ist an natürlichen DNA-Matrizen promotorspezifisch, d.h. es werden nur Phosphodiesterbindungen katalysiert, die der Startsequenz der dort gebildeten RNA entsprechen (Johnston & McClure, 1976; McClure *et al.*, 1978; Cech *et al.*, 1980). Analog gilt dies aber auch für synthetische, promotorlose DNA-Matrizen, z.B. poly[d(A-T)] (Oen & Wu, 1978; pApU-Synthese mit AMP und UTP).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß an Stelle von ATP, ADP oder AMP auch modifizierte Nukleotide (z.B. NAD, FAD) als Startnukleotide bei der abortiven Dinukleotidsynthese eingesetzt werden können (McClure & Cech, 1978; Malygin & Shemyakin, 1979; Shemyakin & Malygin, 1980; Mann *et al.*, 1983).

Arkady Mustaev und Mikhail Grachev (Smirnov *et al.*, 1981, 1984; Grachev & Mustaev, 1982; Grachev *et al.*, 1986b, 1987a) entwickelten, auch ausgehend von diesen Beobachtungen, eine Methode, die nicht zur abortiven Synthese von Dinukleotiden, dagegen aber zu einer selektiven Affinitätsmarkierung der RNA Polymerase aus *E. coli* führte. Diese Technik umgeht die oben genannten Schwierigkeiten konventioneller Affinitätsmarkierungen und liefert nicht Information über eine bestimmte Situation, sondern ausschließlich über den am katalytischen Prozess beteiligten Bereich.

Dieser autokatalysierten, funktionellen Affinitätsmarkierung liegt folgende Strategie zugrunde:

In einem ersten Schritt wird ein nicht-radioaktives Nukleotid-derivat, das am terminalen Phosphat eine chemisch reaktive Gruppe trägt (alkylierend ($-\text{CH}_2\text{Cl}$), Imin-bildend ($-\text{CHO}$) oder phosphorylierend (z.B. Trimetaphosphat)) in Gegenwart einer Promotor enthaltenden DNA kovalent an die RNA Polymerase gekoppelt. Falls die auf diese Weise modifizierten Enzyme ein Derivat derart gebunden haben, daß es richtig im aktiven Zentrum positioniert sein kann ohne gleichzeitig die katalytische Aktivität zu zerstören, so sollte dieses als Startnukleotid für eine nachfolgende Polymerase-reaktion dienen können. Andersartig oder an anderen Stellen gebundene Derivate kommen dafür nicht in Frage.

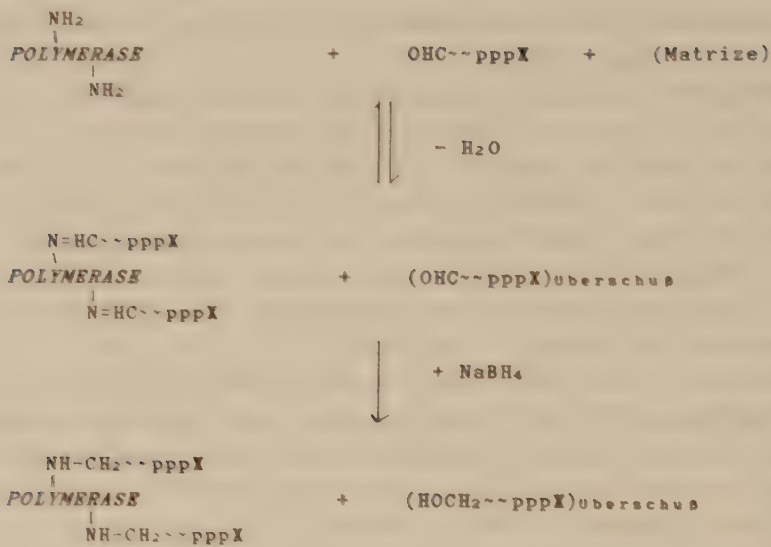
Im nächsten Schritt wird nach Zugabe eines radioaktiven Nukleosidtriphosphates als zweites Substrat über die sich bildende(n) Phosphodiesterbindung(en) eine Markierung kovalent an das Enzym gebunden (s. Schema, S. 6/7).

Nach der Auftrennung der Untereinheiten der so behandelten RNA Polymerase sollte deshalb eine radioaktive Markierung nur an denjenigen Polypeptiden auftreten, die das Nukleotidderivat so gebunden hatten, daß es funktionell als Startnukleotid verwendet werden konnte. Für eine solche Untereinheit ist daher zu fordern, daß sie zur Bildung des aktiven Zentrums beiträgt oder zumindest Bereiche besitzt von denen aus das angeheftete Nukleotidderivat sterisch korrekt dorthin reichen kann.

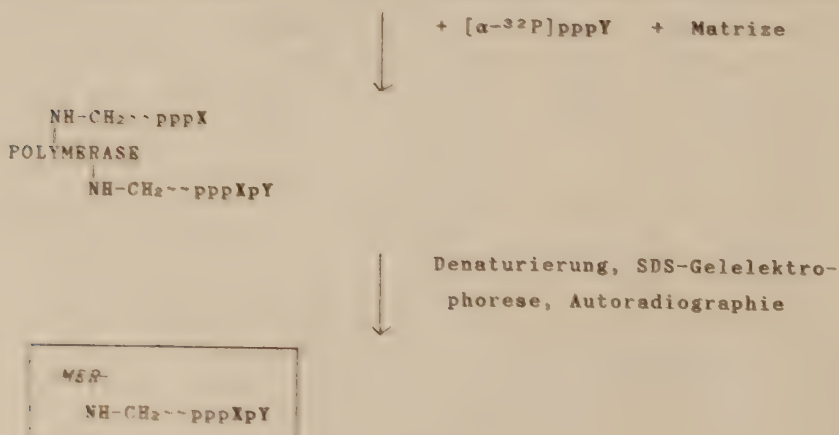
Die radioaktive Markierung einer Enzymuntereinheit wird nach diesen Überlegungen als spezifisch angesehen, wenn sie sich in geeigneten Kontrollen sowohl abhängig von der Reaktion mit einem Nukleotidderivat als auch von den Voraussetzungen für eine enzymatische RNA Polymerase-Aktivität erweist.

Im Fall der RNA Polymerase aus *E. coli* fanden Smirnov *et al.* (1981) und Grachev *et al.* (1987a) eine derartige spezifische Markierung der β -Untereinheit. Setzt man dagegen das Derivat im ersten Schritt in radioaktiver Form ein, so findet man tatsächlich auch eine zusätzliche Bindung an anderen Untereinheiten (β' , σ und α mit [^{32}P]ATmP; Smirnov *et al.*, 1981, 1984).

Chemische Modifizierung

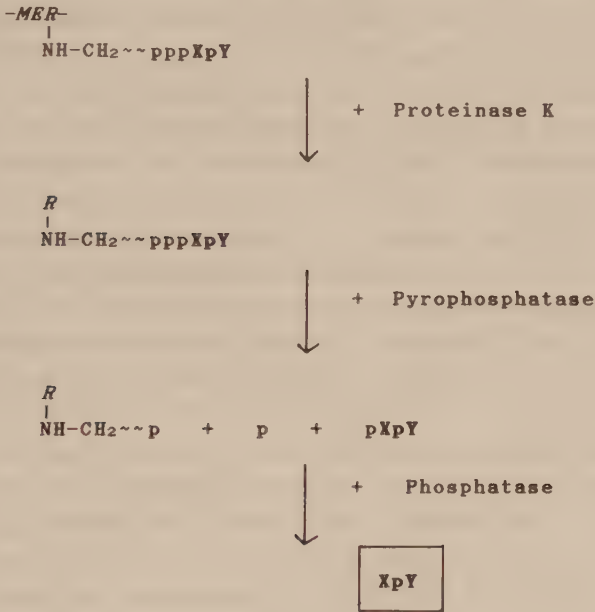


Enzymatische Reaktion und Nachweis



Abspaltung des gebundenen Oligonukleotids

Isolierung der radioaktiv markierten Untereinheit :



Strategie zur funktionellen Affinitätsmarkierung von RNA Polymerasen mit Aldehyd-Derivaten und zum Nachweis des gebundenen Oligonukleotids

Die Erläuterungen zu diesem Schema befinden sich im Text der Einleitung und in Kap. 2.1.3. des Ergebnisteils.

Das dieser Arbeit primär zugrundeliegende Problem war es nun festzustellen, ob diese Methode auf andere RNA Polymerasen anwendbar ist oder ob sie aus technischen oder funktionellen Gründen auf die *E. coli* RNA Polymerase beschränkt ist. Bei einer Affinitätsmarkierung in anderen Systemen müßten die gefundenen Bereiche als zueinander homolog in funktioneller Hinsicht betrachtet werden. Damit wäre die Grundlage für die weitere Frage nach der evolutionären Verwandtschaft der funktionell homologen Bereiche und der aktiven Zentren, besonders auch in Verbindung mit bereits bekannten Primärstrukturdaten, geschaffen.

Aus der Vielzahl der von Grachev *et al.* (1986b, 1987a) beschriebenen und an *E. coli* RNA Polymerase getesteten Derivate wurden solche mit Aldehydgruppen als besonders geeignet ausgewählt, da sie nach einer zuerst reversiblen Iminbindung mit Aminogruppen am Enzym³ durch die anschließende Reduktion irreversibel fixiert, und gleichzeitig überschüssige Derivate inaktiviert werden. Durch diese eindeutige Trennung der chemischen Modifizierung von der nachfolgenden enzymatischen Reaktion wird verhindert, daß das Startnukleotid erst nach seiner Polymerisation und möglichen Translocierung aus dem aktiven Zentrum gebunden wird (s. Schema, S. 6/7). Damit drängt sich umgekehrt die Frage nach den Veränderungen der Befunde auf, die möglicherweise bei der Reduktion erst nach einer Polymerisation in Erscheinung treten.

Paradigmatisch für die Vielzahl DNA-abhängiger RNA Polymerasen werden die drei nukleären Enzyme I, II und III aus Hefe, die Weizenkeim RNA Polymerase II, das Enzym aus dem Cyanobakterium *Anabaena* und die völlig anders strukturierten Polymerasen aus den Coliphagen T3, T7 und N4 (zwei verschiedene Enzyme) untersucht.

³Die dazu erforderlichen NH_2 -Gruppen von Lysin-Seitenketten sind im oder in der Nähe des aktiven Zentrums zu erwarten, da basische Aminosäuren dort zur Stabilisierung der negativ geladenen Reaktionspartner beitragen sollten.

Besonderes Gewicht soll auch auf den Nachweis gelegt werden, daß die Affinitätsmarkierung tatsächlich autokatalysiert erfolgt, d.h. auf der Katalyse von Phosphodiesterbindungen beruht, die auch durch die Komplementarität der Nukleotide zur kodierenden Sequenz gesteuert wird.

Weitere Untersuchungen hatten das Ziel herauszufinden, welche Spezifität in verschiedener Hinsicht eine derartige Affinitätsmarkierung erlaubt. Zum einen wurde versucht in nur teilweise gereinigten oder rohen Präparationen (Weizenkeim und Tabak) eine Affinitätsmarkierung zu erreichen; zum anderen wurde die Frage gestellt, ob sich die ausgeprägte Initiationsspezifität der T7 RNA Polymerase an homologen Promotoren auch bei dieser funktionellen, autokatalysierten Affinitätsmarkierung widerspiegelt oder ob sie durch die chemische Modifizierung zerstört wird.

Ein unabhängiger Teil, der aber auch in Zusammenhang mit der funktionellen Affinitätsmarkierung diskutiert wird, untersucht schließlich einige Aspekte der Produktbildung der *primer*-unabhängigen und *primer*-abhängigen abortiven Dinukleotidsynthese der Weizenkeim RNA Polymerase II in Abhängigkeit von der Substratkonzentration und der Matrize.

M A T E R I A L

Der Hersteller oder die Vertriebsgesellschaft sind in Klammer nach den einzelnen Artikeln angegeben; mehrfach genannt werden:

- | | |
|--|---------------------------|
| 1 = Boehringer Mannheim | 2 = Sigma Chemie, München |
| 3 = Serva, Heidelberg | 4 = Merck, Darmstadt |
| 5 = New England Biolabs, Schwalbach | |
| 6 = Amersham Buchler, Braunschweig | 7 = Fluka, Neu-Ulm |
| 8 = Pharmacia, Freiburg | 9 = Difco, Michigan, USA |
| 10 = Geschenk der Bayer AG, Leverkusen | |
| 11 = Whatman, Maidstone, England | |

1. CHEMIKALIEN

Alle Standardchemikalien und Salze wurden in *p.a.* Form verwendet (2,3,4, Riedel-deHaën).

Insbesondere wurden eingesetzt:

- α -Amanitin (1); Acrylamid, 2x krist. (3); Agarose (2);
 Ampicillin (1); Bactotrypton (9); Brij 35 (3);
 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid (2); Bromphenolblau (4);
 4-[N-(2'-Chloroethyl),N-methyl]aminobenzaldehyd (10);
 Coomassie G250 (3); Dicyclohexylcarbodiimid (2);
 Ethidiumbromid (1,2); Glaswolle, silanisiert (3); Hefeextrakt (9);
 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure (1, Interchem, München) 4-Hydroxybenzaldehyd (7); 2-Hydroxybenzaldehyd (7);
 Mannitol (2); N,N'-Methylenbisacrylamid (3);
 Morpholinoethansulfonsäure (2); Natriumborhydrid (7);
 Natriumdodecylsulfat (3); Nonidet P40 (2); Percoll (8);
 Poyethylenglycol 6000 (4); Polymix P (10);
 Pyridoxal-5'-Phosphat (2); Rinderserumalbumin (1);
 Spermidin-3 HCl (3); Spermin-4 HCl (3); Tetracyclin (2);
 N,N,N',N'-Tetramethylen-diamin (3); Triethylamin (4);
 Triethylammoniumchlorid (7); Tris(hydroxymethyl)aminomethan (2);
 Triton X-100 (3);

Zur Autoradiographie und Photographie wurden verwendet:

Röntgenfilme Kodak X-OMAT AR und Fuji RX-100; Verstärkerfolien Dupont Cronex Quanta IIB; Entwickler Kodak D-19; Fixierer Agfa-Gevaert G334; Polaroidfilm T 107.

2. CHROMATOGRAPHIE

Dünnschichtchromatographie:

PEI-Cellulose F254 (4, Nr. 5579); Whatman 3MM (11)

Silicagel 60 F254 (4, Nr. 5715)

Säulenchromatographie:

Biogel P6 (100-200 mesh, Biorad); Dowex 50 WX A (3);

DEAE-Cellulose DE52 (11); Phosphocellulose P11 (11)

Sephadex G50 (8, medium)

3. GERÄTE

Neben Standardlaborgeräten wurden verwendet:

Ausschwingzentrifuge Cryofuge 6-6 (Heraeus Christ)

Densitometer (Hirschmann elscript 400)

Miracloth (Calbiochem)

Nylon-Netze (130, 100, 80 und 20 μ m Durchmesser: Eckert & Cie AG, Waldkirch ; 70 und 22 μ m : Schweizer Seidengazefabrik, Zürich)
Parr-Bombe (Semi-Micro Cell Disruption Chamber, Kontes, Vineland, NJ)

Radioaktivitäts-Scanner (Automatic TLC Analyzer mit Chromatography Data System LB 512, Berthold)

Szintillationszähler (Philips PW 4700 und Isocap/300, Searle)

Ultra-Turrax T45 mit Messer 6G (Janke & Kunkel)

Ultrazentrifuge (Beckman L8-70 mit Rotoren SW27, SW56, VTi65)

WKF-Zentrifuge (G50k, WKF)

4. NUKLEOTIDE UND NUKLEINSÄUREN

ATP, CTP, GTP, UTP (1)

5'-ADP, 5'-GDP, 5'-AMP, 5'-GMP, 5'-UMP (1,2)

3'-AMP, 3'-CMP, 3'-GMP, 3'-UMP (1,2)

ApA, ApC, ApU, GpA (2) ApApU, ApUpG, ApCpC (2) ApUp (2)

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ (400 und
3000 Ci/mMol: 6)

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (3000 Ci/mMol: 6)

16/23S rRNA aus *E. coli* (1)

Kalbstymus DNA (1)

poly[d(A-T)] (1)

T7 DNA (von W. McAllister, Brooklyn)

T3 DNA (von W. McAllister, Brooklyn)

T7 D111 DNA (von C. Jung, Arbeitskreis Prof. Hartmann)

Plasmide:

pBR322 (Arbeitskreis Prof. Hartmann) pUC12 (Arbeitskreis Prof.
Hartmann) pSS (von H. Mosig, Arbeitskreis Prof. Hartmann)

pSS83 (K. Geider, Heidelberg)

pId (Schäffner, 1984)

ple (diese Arbeit)

cg2, cg3 (P. Zambryski, Gent)

cg2RR329 (diese Arbeit)

5. ENZYME

RNA Polymerasen

Weizenkeim RNA Polymerase II (s. Methoden, und von H. Sieber,
Arbeitskreis Prof. Hartmann)

Hefe RNA Polymerase I und II (*S. cerevisiae*, von M. Riva, Saclay)

Hefe RNA Polymerase III (*S. cerevisiae*, von A. Ruet, Saclay)

Anabaena RNA Polymerase (Stamm 7120, von G. Schneider, Chicago)

Micrococcus luteus (von B. Rauschel, Arbeitskreis Prof. Hartmann)

Bakteriophage N4 Virion RNA Polymerase (von S. Glucksmann, Chicago)

Bakteriophage N4 RNA Polymerase Aktivität II (von K. Abrevaya, Chicago)

Bakteriophage T7 RNA Polymerase (von W. McAllister, Brooklyn)

Bakteriophage T3 RNA Polymerase (von W. McAllister, Brooklyn)

Sonstige Enzyme:

Alkalische Phosphatase (1, Kälberdarm, Suspension und Präparat für Molekularbiologie) Cellulase (3) Chymotrypsin (3) DNase I

(1, Nr. 104132) Klenow Fragment der *E. coli* DNA Polymerase (1)

Pectinase (3) Phosphodiesterase I (8, *Crotalus adamanteus*)

Pronase (1) Proteinase K (1,4)

Restriktionsenzyme (1,5): *AluI*, *AvaI*, *BamHI*, *EcoRI*, *HaeIII*,

HindIII, *HpaII*, *NciI*, *NcoI*, *RsaI*, *SalI*

RNase A (1) RNase T1 (2) RNase T2 (2, grade VI, ansonsten

Phosphatase-verunreinigt) Saure Pyrophosphatase (Promega, Tabak)

T4 DNA Ligase (1) T4 Polynukleotidkinase (1) Trypsin (2,

TPCK-behandelt)

6. BAKTERIEN UND PFLANZENMATERIAL

E. coli-Stämme DH1, HB101, JM83 (Arbeitskreis Prof. Hartmann)

Suspensionskultur von *Nicotiana tabacum* var. *White Burley*:

habituierte Wildtyp-Zelllinie und mit *Agrobacterium tumefaciens*

Stamm A6 infizierte Tumorklinie (L. Willmitzer und H. Steinbiß,

Köln)

Weizenkeime (Kraemer Kunstmühle, München)

METHODEN

1. ENZYMATISCHE REAKTIONEN AN NUKLEINSÄUREN UND NUKLEOTIDEN

1.1. Restriktionsverdauung von DNA

Die Hydrolyse von DNA mit Restriktionsenzymen wurde unter den von Maniatis *et al.* (1982) angegebenen Salz- und Temperaturbedingungen durchgeführt.

1.2. Auffüllen des Gegenstranges an 5'-überhängenden DNA-Enden

Die enzymatische Reaktion erfolgte ohne radioaktive Desoxynukleosidtriphosphate mit dem Klenow-Fragment der *E. coli* DNA Polymerase I nach Maniatis *et al.* (1982); die dort angegebene Trennung von überschüssigen Substraten mit einer Sephadex-Säule unterblieb.

1.3. 5'-Phosphorylierung von 5'-OH-DNA

5'-dephosphorylierte Oligonukleotide wurden mit ATP mittels T4 Polynukleotidkinase phosphoryliert; falls dadurch eine radioaktive Markierung erreicht werden sollte, wurde nicht umgesetztes [γ - ^{32}P]ATP durch Zentrifugation über eine 1 ml-Sephadex G50-Säule abgetrennt (Maniatis *et al.*, 1982).

1.4. Ligierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mit einem *EcoRI-Linker* oder zum Einbau in geöffnete, 5'-dephosphorylierte Plasmidvektoren mit T4 DNA Ligase nach Dugaiczky *et al.* (1985) verknüpft.

1.5. Dephosphorylierung

Zur Abspaltung von einfach gebundenen Phosphatgruppen wurde alkalische Phosphatase aus Kälberdarm nach Herstellerangaben bei 37°C verwendet; falls das pH der Lösung durch eine vorangegangene Manipulation kleiner als 7,5 war, wurde entsprechend Tris- oder Tris-HCl-Lösung zugegeben.

1.6. Nuklease-Verdauung von DNA, RNA oder Ribonukleotiden

DNase I

Die Verdauung mit DNase I erfolgte nach Herstellerangaben in Gegenwart von 1 mM CaCl₂ bei einem pH-Wert von 7,5 bis 8 bei 37°C wie angegeben (Enzymmenge, Zeit). Die Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml wurde bei -20°C aufbewahrt (Maniatis *et al.*, 1982).

RNase A

Die zu hydrolysierende Probe wurde nach Herstellerangaben bei einem pH-Wert von etwa 7,5 bei Raumtemperatur oder 37°C wie jeweils angegeben (Enzymmenge, Zeit) verdaut. Die RNase A-Stammlösung wurde nach Maniatis *et al.* (1982) vorbehandelt und aufbewahrt.

RNase T1

Die Verdauung erfolgte nach Herstellerangaben bei pH 7,5 bis 8 15 min lang mit der angegebenen Enzymmenge bei 37°C. Das verwendete Enzym war in dieser Arbeit nicht zur Entfernung von kontaminierenden DNase- oder Protease-Aktivitäten wie RNase A nach Maniatis *et al.* (1982) vorbehandelt.

RNase T2

Die Verdauung erfolgte nach Herstellerangaben bei pH 4,5 20-60 min lang mit etwa 1 U/Ansatz (5-10 µl). Als Puffer wurde 15-30 mM Ammoniumacetat pH 4,5 verwendet und gegebenenfalls durch Zugabe von 100 mM CH₃COOH auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Das käuf-

liche Lyophilisat war in H_2O in einer Konzentration von 1 U/ml gelöst bei 5°C stabil.

Phosphodiesterase I

Die zu behandelnde Probe wurde nach Herstellerangabe bei pH 8,8 (10-20 mM Tris-HCl) mit etwa 0,05 µg/ml Enzym (*Crotalus adamanteus*; aus einer bei 5°C aufbewahrten 2 mg/ml Stammlösung) bei 37°C 2-4 h lang verdaut.

2. PLASMIDE

2.1. Klone und Subklone

pId

Das größte, 4,5 kbp lange *SalI*-Fragment aus pSS83 (Schweitzer *et al.*, 1980) enthält das Nopalindehydrogenase-Gen (vgl. Fig. 28, außerhalb der angegebenen *HindIII*-Stellen befindet sich jeweils eine *SalI*-Stelle). Es wurde in die *SalI*-Stelle des Vektors pBR322 (Bolivar *et al.*, 1977) ligiert und in kompetente *E. coli* DH1-Zellen transformiert (Hanahan, 1983), die dadurch Ampicillin-resistent und Tetracyclin-sensitiv wurden. Die rekombinante DNA wurde nach Schnellaufschlüssen (Maniatis *et al.*, 1982) durch Restriktionsverdauungen mit *EcoRI*, *HindIII* oder *SalI* identifiziert und die Einbaurichtung des Nopalindehydrogenase-Gens im Uhrzeigersinn durch die Größe der beiden *BamHI*-Fragmente (5,7 und 3,1 kbp) charakterisiert.

pIe

Das isolierte Fragment pId/*HindIII*,*BamHI*-3 (s. Fig. 28, Region d) wurde zwischen die *HindIII*- und *BamHI*-Stellen des Vektors pBR322 (Bolivar *et al.*, 1977) eingebaut und damit kompetente *E. coli* HB101 transformiert (Maniatis *et al.*, 1982; Heinrich, 1987). Nach

Selektion auf Ampicillin-resistente und Tetracyclin-sensitive Klone wurde der gewünschte Einbau durch Restriktionsverdauung mit *Hind*III, *Bam*HI und *Eco*RI bestätigt.

cg2 und cg3

Die aus mit *Agrobacterium tumefaciens* infizierten Tabakzellen isolierten *Eco*RI/*Hind*III-Fragmente enthalten das Gen für die Nopalindehydrogenase, die rechte Tumor-DNA-Grenze (vgl. Fig. 28) und etwa 575 bp (cg2, Isolat nach Infektion mit Stamm T37) bzw. 490 bp (cg3, Stamm C58) pflanzliche DNA stromaufwärts des Gens (Zambryski *et al.*, 1982). Diese Fragmente wurden, zwischen die *Eco*RI- und *Hind*III-Stellen von pBR322 ligiert, von Patricia Zambryski, San Francisco (Gent) zur Verfügung gestellt.

Zur Anreicherung wurde die DNA in kompetente *E. coli* HB101 transformiert und dadurch Ampicillin-resistente und Tetracyclin-sensitive Klone erhalten. Die Plasmide wurden durch Restriktionsverdauungen mit *Eco*RI, *Eco*RI/*Hind*III und *Bam*HI identifiziert. Im Laufe der weiteren Charakterisierung und Subklonierung wurde festgestellt, daß der pflanzliche, nicht sequenzierte Teil der eingebauten Fragmente in beiden Fällen keine Erkennungsstellen für *Nci*I, *Nco*I oder *Sal*I besitzt; cg2 hat dort auch keine *Rsa*I-Stelle, während cg3 von diesem Enzym etwa 140 bp von der *Eco*RI-Stelle entfernt hydrolysiert wird (ohne Belege).

Um die Fragmente durch eine einfache Verdauung mit *Eco*RI isolieren zu können, wurde an die *Hind*III-Stelle ein *Eco*RI-Linker (5'-CGGAATTCG-3') ligiert und das nach einer Verdauung mit *Eco*RI isolierte Fragment in die *Eco*RI-Stelle des Vektors pBR322 eingebaut und in *E. coli* HB101 transformiert (Maniatis *et al.*, 1982; Hanahan, 1983; Heinrich, 1987). Die erhaltenen Klone wurden cg2RR/ oder RL bzw. cg3RR/ oder RL genannt; das erste R weist auf die beiden *Eco*RI-Enden, der zweite Buchstabe auf eine Orientierung des Insert im Uhrzeigersinn wie in cg2, cg3 (R) oder entgegengesetzt (L) hin.

cg2RR329

cg2 wurde mit *RsaI* hydrolysiert, mit einem *EcoRI*-Linker 5'-CGGAATTCG-3' verknüpft und anschließend mit *EcoRI* und *BamHI* verdaut. Das isolierte Fragment cg2/*RsaI*, *EcoRI*, *BamHI*-3 wurde in die *EcoRI*-Stelle von pUC12 (Viera & Messing, 1982) ligiert. Nach einer Transformation wurden die Plasmide von farblosen Ampicillin-resistenten *E. coli* JM83-Kolonien (Maniatis *et al.*, 1982; Hanahan, 1983; Heinrich, 1987;) durch Verdauung mit *EcoRI* und *NciI* identifiziert und die Richtung des Einbaus bestimmt. cg2RR329 enthält das Nopalindehydrogenase-Gen auf dem Insert in gleicher Orientierung wie lacZ' (zweiter Buchstabe R); das erste R bezeichnet die beiden *EcoRI*-Enden des Fragments. Es wurde auch der umgekehrte Einbau, cg2RL329 isoliert.

Nach einer Hydrolyse mit *EcoRI* erlauben beide Klone die Isolierung des Nopalindehydrogenase-Promotors mit der gesamten in cg2 enthaltenen 5'-Region; das 3'-Ende wird durch die *RsaI*-Stelle an Position 870 der Sequenz des Gens (Depicker *et al.*, 1982; Bevan *et al.*, 1983; vgl. Fig. 28) und den angehängten *EcoRI*-Linker definiert. Bei einer korrekten Initiation mit einem Start an Nukleotid 550 der Sequenz würde demnach ein 329 Nukleotide langes *run off*-Transkript erwartet.

pAR436 und pAR219

E. coli Zellen, die das Plasmid pAR436 mit dem ϕ 10 Promotor (57,08 bis 60,67% des Genoms) des Bakteriophagen T7 bzw. pAR219 mit dem ϕ 2.5 Promotor (21,91 bis 23,19% des Genoms in pBR322) enthalten (Studier & Rosenberg, 1981), wurden von W. McAllister, Brooklyn zur Verfügung gestellt.

2.2. Anreicherung

Alle verwendeten Klone wurden in 50 μ g/ml Ampicillin enthaltendem Medium bei 37°C gezüchtet; DHL-Medium (20 g Bacto-Trypton, 5 g

Hefeextrakt, 5 g MgSO_4 / 1000 ml H_2O , pH *ad* 7,6 mit KOH; Hanahan, 1983) im Fall von *E. coli* DH1 und LB-Medium (10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl / 1000 ml H_2O , pH *ad* 7,5 mit NaOH; Maniatis *et al.*, 1982) im Fall von *E. coli* HB101 und JM83¹. Bei einer optischen Dichte von $0,9 \pm 0,1$ (546 nm-Filter) wurde 150 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol (aus 75 mg/ml Lösung in Methanol) zugesetzt und die Suspension weitere 16-18 h geschüttelt und dann die Bakterien bei 4°C durch Zentrifugation geerntet. Die Zellen im Niederschlag aus 1 l Medium wurden in 12-14 ml 25% Saccharose, 50 mM Tris-HCl pH 8,0 suspendiert. Durch Zugabe von 1 ml frischer Lysozym-Lösung (10 mg in 125 mM Tris-HCl pH 8,0; Behandlung 10-15 min) und anschließend 2 ml 0,5 M EDTA und Triton X-100 (0,2% Triton, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 60 mM EDTA) wurden sie aufgeschlossen. Das nach einer Zentrifugation (SS34/ 20000 Upm/ 70 min/ 4°C) klare, die Plasmid-DNA enthaltende Lysat wurde direkt weiterverwendet oder alternativ das Plasmid durch Zugabe von 0,14 Volumen 5 M NaCl und 0,28 Volumen 50% Polyethylenglycol 6000 (*ad* 0,5 M NaCl/ 10% PEG 6000) im Eisbad über Nacht ausgefällt, 10 min bei 4000 g (SS34/0°C) abzentrifugiert und in 10 mM Tris-HCl pH 8,0/ 1 mM EDTA aufgenommen (Schleif & Wensink, 1981). Nach Zugabe von 13,80 g CsCl und 1,344 ml Ethidiumbromid pro 10 ml Lösung (Dichte = 1,57 g/ml) erfolgte eine Dichtegradientenzentrifugation bei 60000 Upm/ 18°C/ 4,5 h und/oder bei 48000 Upm/ 18°C/ 18 h (Beckman VTi65-Rotor). Die im langwelligen UV-Licht sichtbare Plasmidbande wurde wie beschrieben, aber direkt in eine Kunststoffspritze hinein, isoliert. Durch 4-5malige Extraktion mit n-Butanol wurde Ethidiumbromid entfernt und die farblose DNA-Lösung gegen 10 mM Tris-HCl pH 8,0/ 0,1 mM EDTA dialysiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm (1 O.D. = 50 $\mu\text{g/ml}$); falls nötig wurde die DNA durch Ethanolfällung (2,5 oder 3 Volumen) in Gegenwart von 0,1 M NaCl konzentriert.

¹Zum Wachstum auf Agarplatten wurde zusätzlich 15 g/l Bacto-Agar vor dem Autoklavieren zugegeben.

3. ANREICHERUNG DER RNA POLYMERASE II AUS WEIZENKEIMEN

Aus 500 oder 1000 g Weizenkeimen wurde die DNA-abhängige RNA Polymerase II nach Jendrisak und Burgess (1975) angereichert. Abweichend von dieser Vorschrift unterblieb die Ammoniumsulfat-Fällung vor der Phosphocellulose-Säulenchromatographie, statt dessen erfolgte lediglich eine Dialyse gegen TEDG/75 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Das Volumen der Phosphocellulose-Säule wurde auf 50 ml/kg Ausgangsmaterial verdoppelt. Die von dieser Säule eluierten aktiven Fraktionen wurden aliquotiert und in flüssigem N_2 eingefroren. Die in dieser Arbeit verwendeten Polymerasepräparationen enthielten 0,6 bis 1,0 mg/ml Protein.

Während der Anreicherung wurde die Proteinmenge durch die UV-Absorption bei 280 nm abgeschätzt und erst anschließend mit Rinderserumalbumin als Standard quantitativ bestimmt (s. 7.1.2.). Der Aktivitätstest erfolgte unter den angegebenen Bedingungen, aber in einem Volumen von 20 μl und mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ (s. 8.).

Als günstig und beschleunigend erwies sich die Verwendung der WKF-Zentrifuge G50k mit sechs Stahlbechern (Volumen = 6 x 870 ml; Einstellung 7000 Upm/ 10-15 min) für die zahlreichen Zentrifugationen größerer Volumina in der Anfangsphase der Anreicherung. Da die Deckel der Becher ganz abgenommen werden können, ist es besonders einfach, das Polymin P-Präzipitat schnell und vollständig mit einem Teigschaber nach der Zentrifugation zur weiteren Extraktion zu sammeln.

4. TABAK-ZELLKULTUREN

Eine habituierte Wildtyp-Zelllinie *Nicotiana tabacum* var. *White Burley* und eine mit *Agrobacterium tumefaciens* A6 infizierte Tumoralinie des gleichen Stamms (Willmitzer & Wagner, 1981) wurde von Lothar Willmitzer, Berlin (Köln) und Horst Steinbiß, Köln überlassen.

Die Propagation und die Kultur der Zellen in Suspension erfolgte gemäß deren Hinweise. Beide Kulturen wuchsen in LS-Medium (Linsmaier & Skoog, 1965) ohne Phytohormone in Schüttelkultur (100-130 Upm) bei 24-26°C und Dauerlicht.

Die Nährlösung wurde in 50 ml Portionen in 300 ml Erlenmeyerkolben, die mit einem gepressten Wattestopfen und Alufolie verschlossen waren, autoklaviert und bis zu sechs Wochen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Zum Gießen von Agarplatten ($\varnothing = 5$ cm) wurde 1,5 g Agar/ 200 ml Medium (0,75%) vor dem Autoklavieren zugesetzt.

LS-Medium (ohne Phytohormone)

Pro 1 l Medium wurden verwendet (die Stammlösungen waren bei -20°C eingefroren) :

20 g Saccharose		gelöst in 800-900 ml ddH ₂ O	
+ 20 ml	NH ₄ NO ₃ , KNO ₃ , MgSO ₄	:	165 g NH ₄ NO ₃
			190 g KNO ₃
			37 g MgSO ₄
			ad 2000 ml
+ 2 ml	KH ₂ PO ₄	:	17 g KH ₂ PO ₄
			ad 200 ml
+ 2 ml	CaCl ₂	:	44 g CaCl ₂
			ad 200 ml
+ 2 ml	Fe-EDTA	:	2,78 g FeSO ₄ · 7H ₂ O
			3,73 g Na ₂ EDTA · 2H ₂ O
			getrennt gelöst,
			ad 200 ml
+ 2 ml	Spurenelemente	:	0,62 g H ₃ BO ₃
			1,69 g MnSO ₄ · H ₂ O
			0,86 g ZnSO ₄ · 7H ₂ O
			1,0 ml 0,5 M KI
			1,0 ml 0,1 M Na ₂ MoO ₄
			0,1 ml 0,1 M CuSO ₄
			0,1 ml 0,1 M CoCl ₂
			ad 200 ml
+ 2 ml	myo-Inosit, Thiamin	:	10 g myo-Inosit
			40 mg Thiamin · 2HCl
			ad 200 ml

ad 1000 ml , ad pH 6,3 mit NaOH

4.1. Suspensionskultur

Wöchentlich wurden - sicherheitshalber an zwei verschiedenen Wochentagen - Zellen aus je 2-3 Kolben jeder der beiden Kulturen nach kurzem Absetzen der Zellen aus dem oberen, lockeren Bereich in eine sterile Glaspipette (Öffnung etwa 1,5-2 mm, Volumen etwa 2-2,5 ml; 6-8 Stück mit aufgesetztem Gummihütchen zum Hochsaugen in Aludose autoklaviert für jeden Passagier-Tag) hochgesaugt und 1,5 bis 3 Füllungen² in frisches Medium transferiert. Dieses Vorgehen ist wichtig, da dadurch gewährleistet wird, daß nur kleinere und vitale Zellaggregate propagiert werden und genügend Zellen und altes Medium in die frischen Kulturen gebracht werden, um ein Überleben ohne exogene Phytohormone zu ermöglichen.

Zur Aufzucht größerer Zellmengen (200 bis 1000 g) wurden etwa neun Füllungen der kleinen Glaspipette (s.o.) in 200 ml frisches Medium in einen 1000ml-Erlenmeyer-Kolben transferiert und nach fünf bis sieben Tagen daraus 40 - 50 ml Zellsuspension mit einer Pipettierhilfe und einer 10ml-Glaspipette (mit Watte gestopft autoklaviert, anschließend getrocknet; Durchmesser der Öffnung etwa 3-4 mm) in Fernbachkolben mit 800 ml Medium überimpft. Dadurch bestanden die Kulturen stets aus lockeren, aktiv wachsenden Zellaggregaten; dies ist von großem Vorteil für die nachfolgende Zellkernisolierung und die Solubilisierung von RNA Polymerase Aktivität. Pro Fernbachkolben konnten nach fünf bis sechs Tagen knapp 200 g Zellen durch Abnutschen über einem 130 µm Nylonnetz geerntet werden.

4.2. Callus-Kultur

Zellaggregate aus beiden Suspensionskulturen wurden auf Agarplatten des gleichen Mediums gegeben, wovon einige nach etwa vier bis

²Bei locker gewachsenen Kulturen sind 1,5 Füllungen ausreichend, während ansonsten entsprechend mehr benötigt werden. Bis man die für ein optimales Wachstum nötige Menge in den angeimpften Kolben erfahrungsgemäß abschätzen kann, sollte man mehrere verschiedene Mengen parallel propagieren.

sechs Wochen zu wachsen begannen. Bei der Passage der Zellen wurde dann jeweils darauf geachtet möglichst locker gewachsene Calli auszuwählen, da bisweilen harte und nasse Aggregate auftreten. Damit war eine weitere Sicherung zum Erhalt der Kulturen erreicht, die den Vorteil bietet, daß nur in 5-6wöchentlichem Turnus überimpft werden muß, und gegebenenfalls auch eine Alternative zu den Suspensionskulturen darstellt. Bei Bedarf kann aus diesen Calli innerhalb von drei bis vier Wochen wieder eine gut wachsende Suspensionskultur erzeugt werden, indem lockere Calli-Teile in flüssigem Medium geschüttelt werden.

4.3. Zellkernisolierung

Die Isolierung von Zellkernen aus den beschriebenen Tabakzellen wurde nach Willmitzer und Wagner (1981) erreicht, wobei auf Anregung von Lothar Willmitzer oder eigene Beobachtungen hin einige Verbesserungen durchgeführt wurden.

200 g Zellen (es wurden auch 1000 g verarbeitet, aber aufgrund der großen Materialmenge waren vor allem die Filtrationsschritte aufwendig, ohne proportionale Steigerung der Ausbeute) wurden auf dem Nylonnetz in der Nutsche mit Puffer A (s.u.) gewaschen und danach in 1000 ml Puffer A zur partiellen Andauung der Zellwände mit 150 mg Pectinase und 300 mg Cellulase bei 25°C 60-90 min unter leichtem Schütteln inkubiert bis im Mikroskop erste Protoplasten sichtbar waren, aber die Mehrzahl der Zellen intakt erschienen. Da die Zellen durch die Behandlung im hypotonischen Puffer A geschrumpft waren, wurden sie durch Zentrifugation anstelle einer weiteren Filtration gesammelt (Cryofuge 6-6/ 5 min ohne Bremse/ 1900 Upm/ etwa 1000 g/ 0°C). Genauso wurde nach dem Waschen der Zellen in 500 ml Puffer C (s.u.) verfahren. Nach Suspendierung der Zellen in 300 ml Puffer C wurden sie mit einem Ultra-Turrax T45 Mixstab (Messeraufsatz 6G) homogenisiert, dabei aber die angegebenen Zeiten auf etwa 12 s verkürzt und die Zahl der Wiederholungen (2-4mal) durch eine Überprüfung des Homogenats im Mikroskop nach jeder Behandlung ausgerichtet. Der Aufschluß wurde abgebrochen,

wenn sehr viele freigesetzte Kerne und kaum noch intakte Zellen zu sehen waren.

Vor der Filtration durch die Nylonnetze erwies es sich als vorteilhaft, das Homogenat durch eine Lage Miracloth (s. Material) zu geben, wobei man zuletzt den Rückstand im Tuch leicht auspressen kann. Ein Teil der trotzdem in der zurückbleibenden Zellmasse eingeschlossenen Kerne kann nach Suspendierung in frischem Puffer C und kurzem, erneuten Homogenisieren (8-10 s; etwa halbmax. Geschwindigkeit) und Filtration durch frisches Miracloth gewonnen werden. Die vereinigten Filtrate werden dann ohne Saugen oder Pressen durch Nylonnetze mit 80 oder 70 μm ($\varnothing$ etwa 30 cm) und anschließend 22 oder 20 μm ($\varnothing$ 18 cm) Porenweite in Glastrichtern erneut filtriert. Besonders das 22 (oder 20) μm -Netz verstopft leicht durch Zelltrümmer. Die Netze können aber zwischendurch nach einem Filtrationsgang mit destilliertem Wasser gespült und gesäubert werden.

Die Zentrifugation des letzten Filtrats erfolgte in der Ausschwingzentrifuge Cryofuge 6-6 (2600-2700 Upm ohne Bremse/ etwa 2000 g/ 5 min/ 0°C). Der Rückstand wurde bis zu einer Gesamtmasse von 30 g in Puffer C suspendiert (durch Aufsaugen und Ablassen in eine Glaspipette) und mit 45 g Puffer D (s.u.) gemischt. Die aus diesem Mischungsverhältnis 6:9 (vgl. Willmitzer & Wagner, 1981) resultierende Dichte erwies sich als gut geeignet zur folgenden Sedimentation der Kerne (4mal bei 1000 g/ Labofuge II (Heraeus Christ)/ 2800 Upm ohne Bremse/ 5 min/ 5°C). Die vereinigten Rückstände wurden in 20-25 ml Puffer E (s.u.) suspendiert und die Dichtezentrifugation bei 5000 g/ 5 min ohne Bremse (Hettich Rotixa/ 5400 upm/ Einstellung 98% oder Beckman SW27/ 6200 Upm, jeweils 5°C) durchgeführt. Die oben schwimmende Schicht wurde abpipettiert, mit Puffer C gewaschen, dabei in Eppendorf-Hütchen verteilt, in einer Ausschwingzentrifuge sedimentiert (Runne Mod.85-1/ 2 min, Einstellung 6-7), vom Überstand befreit und

in flüssigem Stickstoff eingefroren³. Die Zahl der Kerne pro Gefäß wurde in einem Aliquot der letzten Waschsuspension (1:10 verdünnt) in einer Zählkammer (40 Felder mit 0,0625 mm² und 0,100 mm Dicke = 0,25 µl) unter dem Mikroskop bestimmt und errechnet⁴. Die Ausbeute lag bei 5 bis 9·10⁷ Kernen/ 200 g Zellen.

Bei einer alternativen, einfacheren Methode wird in flüssigem Stickstoff schockgefrorenes Material im Waring Blendor kurz pulverisiert, in einer Reibschale mit Puffer C weiter homogenisiert und ohne die Filtrationen über die Nylonnetze aufgearbeitet, was jedoch zu weit weniger sauberen Präparationen führt (Lothar Willmitzer, pers. Mitteilung). Versuche, diese Art des Aufschlusses mit den aufwendigeren Reinigungsschritten (Nylonnetze, zwei Dichteentrifugationen) wie oben zu koppeln, ergaben keine befriedigenden Ergebnisse, da die Filtrationen durch die größere Zahl an kleinen Zelltrümmern erschwert wurden und die Präparationen stärker mit Zelltrümmern verunreinigt waren.

Zusammensetzung der Puffer:

jeweils 1x Endkonzentration

A:	127,54 g	Mannitol	700 mM
	10 ml	1 M MES pH 6,0	10 mM
	10 ml	0,5 M EDTA	5 mM
	10 ml	10% Rinderserumalbumin	0,1 %
		ad 1000 ml, pH ad 5,8	
	0,2 ml	1 M Phenylmethylsulfonylfluorid in DMSO, direkt vor Gebrauch zugeben	0,2 mM

Falls Cellulase und Pectinase zugesetzt waren, wurden diese wie von Willmitzer und Wagner (1981) beschrieben vorgereinigt (allerdings nur etwa 8fach) und aufgelöst.

³Äquivalent ist ein Einfrieren bei -80°C nach einer 1:1-Verdünnung mit Glycerin (Lothar Willmitzer, pers. Mitteilung).

⁴Qualitativ kann man die Kerne dadurch nachweisen, indem man zu ein paar Tropfen Untersuchungsmaterial auf einem Objektträger einen Tropfen 10% SDS-Lösung gibt. Aufgrund des DNA-Gehalts wird die Suspension viskos und es lassen sich DNA-Fäden ziehen (Lothar Willmitzer, pers. Mitteilung).

C (5x)	427,87 g	Saccharose	250 mM
	10 ml	5 M NaCl	10 mM
	50 ml	1 M MES pH 6,0	10 mM
	50 ml	0,5 M EDTA	5 mM
	30 ml	Nonidet P40	0,6 %
	50 ml	10% Rinderserumalbumin	0,1 %
	10 ml	75 mM Spermin	0,15 mM
	10 mM	250 mM Spermidin	0,5 mM
		ad 1000 ml, ad pH 6,0	

Dieser 5x-Puffer kann mehrere Wochen bei 5°C aufbewahrt werden;
vor dem Gebrauch werden zugegeben

7 ml	2-Mercaptoethanol	20 mM
1 ml	1 M Phenylmethylsulfonyl- fluorid in DMSO	0,2 mM

D: 46,4 g Percoll (Pharmacia)
12,0 g C (5x), unter Rühren zugeben, frisch
herstellen
ad pH mit HCl

E: 27,0 g Percoll
3,6 g C (5x), unter Rühren zugeben, frisch
herstellen
ad pH 6,0 mit HCl

Die verwendeten Glasgeräte und Nutschen waren autoklaviert, obwohl bei der Aufarbeitung nicht steril gearbeitet wurde. Die Nylonnetze wurden mechanisch mit Wasser gereinigt; danach und vor der nächsten Benutzung wurden sie mindestens über Nacht in SDS-Lösung gelegt.

4.4. Aufschluß der Zellkerne

Der Aufschluß der Zellkerne zur Solubilisierung von RNA Polymerase (II) Aktivität ist in Kapitel 2.2. des Ergebnisteils beschrieben. Die Parr-Bombe wurde nach Vorschrift des Herstellers (s. Material) am Gaseingang mit einem zurechtgeschnittenen Stück Membranfilter (Sartorius Membranfilter SM11306, Cellulose-Nitrat) versehen, autoklaviert und zum Aufschluß an eine N₂-Bombe angeschlossen, deren Reduzierventil einen Ausgangsdruck gleich dem Bombendruck, d.h. bis 200 bar ermöglicht. Nach dem Äquilibrieren des aufzuschließenden Materials bei 100 bar wurde die Gaszufuhr unterbro-

chen und durch langsames, vorsichtiges Drehen der Schraube am Ausgangsstutzen der Inhalt plötzlich dekomprimiert und in ein bereit gehaltenes Eppendorffgefäß abgelassen. Das Gewinde am Ausgangsstutzen kann u.U. mit einer Wicklung Teflondichtungsband zusätzlich abgedichtet werden.

5. SYNTHESE DER ADENOSIN- UND GUANOSINDERIVATE

Die Synthese der Adenosin-Derivate wurde wie von Grachev *et al.* (1986a,b; 1987a) und Knorre *et al.* (1976) beschrieben durchgeführt; die Reinigung der Produkte war jedoch verschieden. In Analogie zu den Adenosin-Derivaten wurden die entsprechenden Guanosin-Derivate hergestellt.

5.1. Triethylammoniumsalz von ATP und GTP

Die Triethylammoniumsalze von ATP oder GTP wurden hergestellt, da man zur Synthese der Trimetaphosphate ATmP oder GTmP ein in wasserfreiem Solvens lösliches Nukleotidsalz benötigt (vgl. auch Glonek *et al.*, 1974).

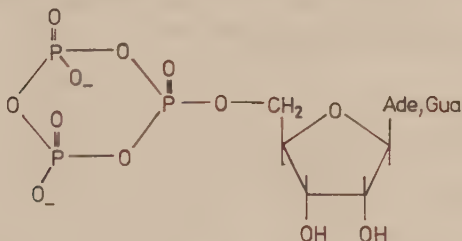
Bis zu 0,8 g ATP- (GTP-)Natrium- oder Lithium-Salz wurden in einer Konzentration von 50 mg/ml in H₂O gelöst, mit Triethylamin auf pH 8-9 eingestellt und auf eine mit (C₂H₅)₃NH⁺ beladene⁵ 80 ml Dowex 50 Kationenaustauschersäule gegeben. Bei einer Fließgeschwindigkeit von 20-30 ml/h wurde im Eluat die optische Dichte bei 260 nm (250 nm) bestimmt und etwa sieben 3ml-Gipfelfraktionen vereinigt und im Vakuum zur Trockene eingeengt (*speed vac concentrator*). Der entstehende, glasige Rückstand löst sich langsam, aber gut in 10 ml trockenem (Mg) Methanol/ g Ausgangsmaterial. Das Triethylammoniumsalz wird schließlich durch Eintropfen dieser Lösung in

⁵Mit mindestens 15 Volumina 0,7 M Triethylammoniumchlorid beladen bis das pH im Eluat mit der Salzlösung übereinstimmte; anschließend wurde mit H₂O bis zur Chloridfreiheit (AgNO₃-Probe) im Eluat gewaschen.

400-500 ml absoluten (Na) Diethylether/ g Ausgangsmaterial als weißes Pulver ausgefällt, 1-2mal mit absolutem Ether gewaschen, kurz im Exsikkator getrocknet und bei -20°C möglichst unter Ausschluß von Feuchtigkeit aufbewahrt. Das Salz kann auch als Lösung in DMSO eingefroren werden. (Nach Arkady Mustaev, pers. Mitteilung).

Alternativ ist die Herstellung des Salzes ausgehend von der reinen Säure des Nukleosidtriphosphats möglich (ATP ist in dieser Form käuflich), wenn dieses in H_2O in Gegenwart eines 10fach molaren Überschusses an Triethylamin gelöst und im Vakuum zur Trockene eingengt wird. Der ölige Rückstand wird wie oben in Methanol gelöst und in absolutem Ether ausgefällt (vgl. Glonek *et al.*, 1974). Dabei entsteht möglicherweise ein öliger Niederschlag, der erneut in trockenem Methanol aufgenommen und in Ether als weißes Pulver präzipitiert wird (Stephan Glaser, pers. Mitteilung).

5.2. Adenosin- und Guanosintrimetaphosphat : ATmP und GTmP



Die Kondensation der Triphosphat-Kette zum Metaphosphat erfolgt in wasserfreiem (s.u.) Lösungsmittel mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC).

Zu 6-10 mg (30-50 μMol) DCC in einem Eppendorfgefäß werden 100 μl einer 0,1 M Lösung von ATP- (GTP-)Triethylammoniumsalz in DMSO⁶ gegeben (9-10 mg = 10 μMol in 100 μl DMSO; das Salz sollte sich innerhalb von 5-10 min, falls nötig unter Schütteln, gelöst haben, ansonsten verläuft die Reaktion nicht normal). Ein Überschuß an

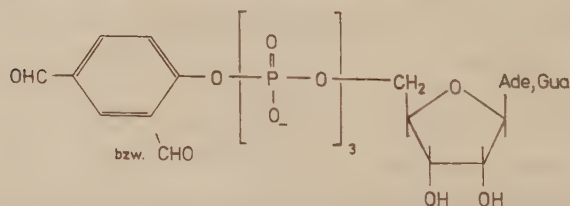
⁶Spuren von H_2O stören nicht, da ein Überschuß an DCC verwendet wird; Grachev *et al.* (1987a) geben sogar einen 15fachen DCC-Überschuß an.

DCC, der sich nicht im DMSO löst, kann als zweite Phase in Form von kleinen Tropfen oder einer dünnen Schicht an der Oberfläche der Lösung erscheinen. Nach Zugabe von 10 μ l 1 M Pyridin·HCl in DMSO beginnt innerhalb von 2-15 min ein farbloser Niederschlag (Dicyclohexylharnstoff) auszufallen. Nach insgesamt 60-90 min bei Raumtemperatur ist die Reaktion weitgehend abgeschlossen⁷.

Falls das NTMP selbst als phosphorylierendes Derivat verwendet werden soll, muß der Überstand nach einer 1:10-Verdünnung mit Methanol oder H₂O sofort zur Modifizierung des Enzym eingesetzt werden; das reaktive Trimetaphosphat wird sehr schnell zum Triphosphat hydrolysiert (Glonek *et al.*, 1974; Halbwertszeit = 3 min bei 20°C, A. Mustaev, pers. Mitteilung). Alternativ ist es möglich, den Ansatz unter möglichst gutem Ausschluß von Feuchtigkeit einige Tage bei -20°C aufzubewahren. Zur Herstellung von gamma-substituierten Nukleosidtriphosphaten kann der Ansatz direkt weiter verwendet werden (s. 5.3.).

5.3. p- oder o-Hydroxybenzaldehydester von ATP und GTP :

pHB-ATP, oHB-ATP, pHB-GTP und oHB-GTP



Die Synthese der gamma-substituierten Nukleosidtriphosphate erfolgt direkt aus den aktivierten Trimetaphosphaten durch Zugabe eines Nukleophils unter basischen, wasserfreien Bedingungen. Zu dem unter 5.2. beschriebenen Ansatz wurde nach 60 min eine Lösung von 30 mg (245 μ Mol) p-Hydroxybenzaldehyd (oder entsprechend

⁷Falls erforderlich kann der Grad der Kondensation zum Trimetaphosphat durch Zugabe eines Überschusses von wässrigem 1 M Ethylen-diamin (pH 7-8) zu einem Aliquot überprüft werden. Das entstehende NH₂-C₂H₄-NH-pppA wandert bei einer anschließenden Chromatographie im System Silicagel 60/ Dioxan:konz.NH₃:H₂O (6:1:4) etwa zweimal schneller als nicht umgesetztes ATP (Knorre, 1976; Arkady Mustaev, pers. Mitteilung).

26 μl o-Hydroxybenzaldehyd) in 50 μl N,N-Dimethylformamid, die mit 30 μl (215 μMol) Triethylamin versetzt worden war, zugegeben. Die im Fall des p-Hydroxybenzaldehyd rötliche oder bei o-Hydroxybenzaldehyd gelbliche Reaktionsmischung wurde 50-70 h bei 25°C im Dunkeln ohne wesentliche Farbveränderung inkubiert und abzentrifugiert. Der Überstand wurde in 10 ml 1% LiCl in Aceton getropft. Dabei entsteht ein klumpiger, durch Verunreinigung in den käuflichen Hydroxybenzaldehyden rötlich, bzw. gelblich gefärbter Niederschlag und leicht verzögert ein weißes, flockiges Präzipitat. Eine chromatographische Untersuchung zeigt, daß das gewünschte Produkt ausschließlich im rötlichen (gelblichen) Niederschlag zu finden ist, während der weiße Niederschlag kein Produkt enthält, sondern (ähnlich wie Hydroxybenzaldehyd, aber nicht weiter charakterisiert) nahe der Fließmittelfront läuft (Silicagel 60/ $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$). Das Gemisch wurde mehrmals mit Aceton gewaschen, wobei das flockige, weiße Präzipitat möglichst vollständig entfernt wurde; dies ist allerdings nicht unbedingt notwendig, erleichtert aber die weitere Aufarbeitung.

Das Präzipitat wurde kurz an Luft getrocknet und in 1,5 ml H_2O aufgenommen. Der Grad der Umsetzung kann nach einer kurzen, etwa 30minütigen Chromatographie eines unbehandelten und eines Phosphatase-verdauten Aliquots im System Silicagel 60/ $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (4:1) durch die UV-Absorption der Verbindungen überprüft werden. Das gewünschte Phosphatase-resistente Produkt tritt in beiden Spuren auf ($R_F = 0,30 \pm 0,02$), nicht umgesetztes ATP (GTP) ($R_F = 0,04$) oder mögliche Spaltprodukte ADP, AMP (GDP, GMP) wandern langsamer und werden durch die Phosphatase zum schneller laufenden Adenosin (Guanosin) ($R_F = 0,51$ bzw. 0,46) abgebaut. Ein eventuell noch vorhandener Anteil des weißen Präzipitats erscheint nahe der Fließmittelfront ($R_F = 0,95$) (Tab. 1).

Da die Präparationen stets noch unumgesetztes Nukleosidtriphosphat (oder NDP, NMP) enthielten, wurde ein zusätzlicher Schritt zur Abtrennung dieser Verbindungen eingeführt:

Nachdem das pH mit Tris auf 7,5 bis 8 gebracht worden war, erfolgte eine 3stündige Verdauung mit 20 U alkalischer Phosphatase

(Boehringer Mannheim, Präp. für Molekularbiologie) bei Raumtemperatur; die Vollständigkeit der Verdauung wurde durch Chromatographie (vgl. Tab. 1) überprüft. Die alkalische Phosphatase wurde durch zweimalige Extraktion mit Chloroform:Isoamylalkohol (24:1 v/v) denaturiert. Anschließend wurde das Gemisch auf eine mit 25 ml 1 M TEAB pH 8 und 30 ml H₂O gewaschene DEAE-Cellulose DE52-Säule mit 1,5 ml Säulenvolumen aufgetragen. Mit H₂O wurde Adenosin (Guanosin) und andere nicht negativ geladene Verunreinigungen eluiert und abgetrennt. Die folgende Elution des negativ geladenen Produkts mit 1 M TEAB pH 8 in etwa 300 µl-Fractionen wurde durch die Bestimmung der optischen Dichte bei 260 (bzw. 250 bei GTP) und 290 nm verfolgt. Die Gipfelfractionen, die den in Tab. 1 aufgeführten Verhältnissen der optischen Dichte entsprachen, wurden vereinigt und im Vakuum eingeeengt und entsalzt (flüchtiges TEAB). Der Rückstand wurde in H₂O aufgenommen, die UV-Absorption gemessen und die Konzentration mit Hilfe der molaren Absorptionskoeffizienten für ATP $\epsilon_{259\text{nm}} = 1,54 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bzw. für GTP $\epsilon_{253\text{nm}} = 1,37 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ errechnet. Diese Konzentrationsangaben berücksichtigen also nicht eine Überlagerung durch die Absorption des Hydroxybenzaldehyd-Anteils, deren genaue Größe nicht bekannt ist; die tatsächlichen Konzentrationen dürften kleiner (höchstens um den Faktor 2) bis annähernd gleich den angegebenen sein⁸. Als Reinheitskriterium wurden die Verhältnisse der optischen Dichten bei 290 nm und 260 nm (Adenosin-Derivate) bzw. 250 nm (Guanosin-Derivate) bestimmt; nach Reduktion mit NaBH₄ nimmt die Absorption bei 290 nm stark ab (Grachev *et al.*, 1986b). Biochemisch getestet wurden die Derivate durch eine Affinitätsmarkierungsreaktion mit Weizenkeim RNA Polymerase II und dabei, soweit vorhanden, mit vorhergehenden Synthesen verglichen. Verschiedene Präparationen der Hydroxybenzaldehyd-Derivate zeichneten sich

⁸Für die isolierte Einheit Hydroxybenzaldehyd oder Methoxybenzaldehyd wurden die Absorptionsspektren von Morton und Stubbs (1940) bestimmt. Aus ihren Daten wurden für die Methoxybenzaldehyde folgende Absorptionskoeffizienten errechnet (jeweils Wellenlänge [nm] / $\epsilon \cdot 10^{-4} [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}]$) :

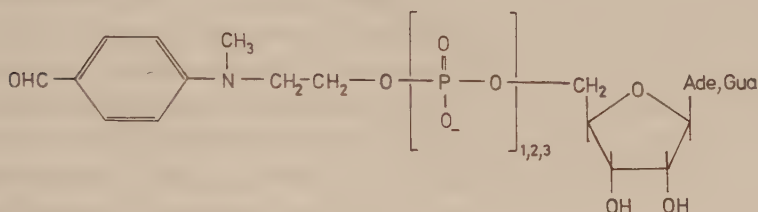
p-Verbindung:	240/ 0,13	250/ 0,42	260/ 1,0	290/ 1,1	300/ 0,50
o-Verbindung:	240/ 0,46	250/ 1,1	260/ 0,81	290/ 0,11	300/ 0,21

durch eine äußerst gute Reproduzierbarkeit der beobachteten Intensität der Affinitätsmarkierung aus.

Die bei -20°C eingefroren und dunkel aufbewahrten Lösungen verlieren innerhalb von mehreren Monaten (länger als 14 Monate wurde nicht getestet) nicht erkennbar an Aktivität⁹.

5.4. Aminobenzaldehydester von AMP, ADP, ATP, GMP, GDP, GTP :

AB-AMP, AB-ADP, AB-ATP, AB-GMP, AB-GDP, AB-GTP



Die Synthese der 4-[N-(2'-Hydroxyethyl),N-methyl]aminobenzaldehyd-Ester erfolgt ausgehend von Li, Na oder Triethylammonium-Salzen der Nukleotide durch Umsetzung mit dem alkylierenden 4-[N-(2'-Chloroethyl),N-methyl]aminobenzaldehyd.

Weg A:

Die Aldehydgruppe wird in ein Acetal überführt, wodurch die Reaktivität der 2-Chloroethylaminogruppe erhöht wird (Arkady Mustaev, pers. Mitteilung).

Acetalbildung:

Zu 70 mg (355 μMol) 4-[N-(2'-Chloroethyl),N-methyl]aminobenzaldehyd in 700 μl DMSO in einem Eppendorfgefäß wurden 200 μl 1,3-Propandiol, 200 μl 2,2-Dimethoxypropan und 50 μl Trifluoressigsäure gegeben. Die Mischung wurde 2 min auf 95°C erhitzt, wobei eine tiefgrüne Färbung eintritt. Die Trifluoressigsäure wird mit 100 μl Triethylamin neutralisiert; die Farbe schlägt nach hell-

⁹Das lyophilisierte Material ist zumindest so stabil, daß es einen Versand auf dem normalen Postweg übersteht und danach erfolgreich zur Affinitätsmarkierung eingesetzt werden kann.

orange um.

Die Umsetzung zum Acetal kann durch Chromatographie (15 min) auf Silicagel 60/ Hexan:Aceton (2:1) überprüft werden; das Acetal läuft schneller als der unbehandelte Aldehyd¹⁰. Die Mischung wird in 4 ml H₂O getropft, der tiefgelbe, ölige Niederschlag abzentrifugiert, mit 2 ml H₂O gewaschen und in 350 µl N,N-Dimethylformamid aufgenommen (1 M Lösung).

Alkylierung:

Zu 10 mg (etwa 11-17 µMol) Nukleotidsalz in 90 µl H₂O werden 90 µl (90 µMol) der obigen Dimethylformamid-Lösung und 10 µl Triethylamin gegeben und 3 h bei 56°C inkubiert. Die Umsetzung kann durch eine Chromatographie einer Probe ohne und mit alkalischer Phosphatase-Verdauung im System Silicagel 60/ CH₃CN:H₂O (4:1)¹¹ kontrolliert werden. Durch den Vergleich mit parallel aufgetragenen Ausgangs-Nukleotiden kann man das Phosphatase-resistente Produkt im UV-Licht identifizieren, das zusätzlich mit Dinitrophenylhydrazin-reagens ebenso wie nicht umgesetztes Acetal, das mit der Fließmittelfront läuft, orangerot gefärbt wird. Besonders im Fall der Triphosphat-Derivate ist das beobachtete Bandenmuster u.U. komplex, da durch Hydrolyse während der Reaktion ADP oder AMP (GDP, GMP) entstehen können, die wiederum zu den entsprechenden Nukleotidderivaten reagieren können. Aufgrund der Wanderungsgeschwindigkeiten NTP < NDP < NMP < AB-NTP < AB-NDP < AB-AMP (s. Tab. 1) und der oben genannten Kriterien kann jedoch das Hauptprodukt AB-ATP (AB-GTP) von den kontaminierenden AB-NDP und AB-NMP unterschieden werden. Analoges gilt für die Synthese von AB-ADP (AB-GDP) durch mögliche AB-AMP- (AB-GMP)-Verunreinigung.

Reinigung:

Überschüssiges, nicht umgesetztes Acetal (Aldehyd) wird aus der Reaktionsmischung durch dreimalige Extraktion in 1 ml absolutem (Na, d.h. Peroxid-frei) Diethylether, der mit 0,5 µl/ml 2-Mercaptoethanol versetzt wurde, abgetrennt. Die Acetalschutzgruppe am

¹⁰Die Acetal- bzw. Aldehyd-Funktion kann durch Besprühen der Platte mit Dinitrophenylhydrazin-Reagens (2,4-Dinitrophenylhydrazin in C₂H₅OH/H₂SO₄) als orangerote Färbung sichtbar gemacht werden.

¹¹Zusätzlich oder alternativ ist auch CHCl₃:CH₃OH:H₂O (4:4:1) als Elutionsmittel möglich.

Produkt bildet sich durch Ansäuern mit Essigsäure auf pH 5-6 und 20minutige Inkubation bei 56°C zur Aldehydfunktion zurück.

Der gesamte Ansatz wird nun dünn-schichtchromatographisch auf 1 bis 1,5 20cm x 20cm Silicagel 60-Platten in $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (4:1) aufgetrennt, die Produktzone im UV-Licht lokalisiert und anhand der vorhergehenden qualitativen Untersuchung (vgl. oben) identifiziert. Das Produkt enthaltende Trägermaterial wird mit einem Spatel abgekratzt und 3-4mal mit 1 ml H_2O eluiert.

Obwohl das Eluat nach einer Chromatographie im UV-Licht homogen erschien, gelang eine Affinitätsmarkierung erst, nachdem das Produkt an eine DEAE-Cellulose DE52-Säule gebunden, mit H_2O gewaschen und mit 1 M TEAB pH 8 (bei AB-AMP, AB-GMP 0,4 M) eluiert worden war (vgl. 5.3.). Möglicherweise ist eine nicht im UV-Licht sichtbare Verunreinigung, die auch aus dem Silicagel-Trägermaterial stammen kann, enthalten.

Es wurden jeweils die Gipfelfractionen vereinigt, die die in Tab. 1 angegebenen Verhältnisse der optischen Dichten bei 350 und 260 nm (bzw. 250 nm bei Guanosin-Derivaten) besaßen. Diese wurden im Vakuum zur Trockene eingengt und entsalzt, in H_2O aufgenommen und lichtgeschützt bei -20°C eingefroren. Eine derartige Aufbewahrung hat über mehrere Monate hinweg keinen erkennbaren Einfluß auf die Intensität des Signals bei einer Affinitätsmarkierung. Die Konzentration wurde wiederum mit Hilfe der Absorptionskoeffizienten für ATP und GTP ermittelt (vgl. dazu 5.3.). Als Reinheitskriterium gilt das hohe Verhältnis der optischen Dichten bei 350 und 260 (250) nm, das nach Reduktion mit NaBH_4 stark erniedrigt wird (s. Tab. 1).

Wichtig ist allerdings, daß die Aktivität bei einer Affinitätsmarkierung verschiedener Synthese der gleichen Verbindung bei diesen Derivaten aus nicht bekannten Gründen stark schwankte, so daß mit einigen Präparationen nur äußerst schwache Markierungen erhalten werden konnten.

Anstelle der stufenförmigen Elution in einem Schritt könnte man einen Gradienten an TEAB verwenden, der möglicherweise eine differenzierte Reinigung erlaubt.

Weg B:

Besonders bei der Synthese der AMP (GMP)-Derivate kann man auf die Acetalbildung der Aldehydfunktion verzichten. Deshalb wurden in dieser Arbeit diese beiden Produkte ausschließlich auf diesem Weg hergestellt.

Zu 10 mg (etwa 17 μMol) AMP (GMP)-Salz gelöst in 90 μl H_2O werden 20 mg (100 μMol) 4-[N-(2'-Chloroethyl),N-methyl]aminobenzaldehyd, gelöst in 90 μl N,N-Dimethylformamid, und 10 μl Triethylamin gegeben. Die Mischung wird 2 h bei 95 °C¹² inkubiert und analog wie bei Weg A aufgearbeitet¹³; lediglich die Behandlung zur Entfernung der Acetalgruppe entfällt hier.

¹²Falls dieser Weg mit NDP oder NTP durchgeführt wird, geben Grachev *et al.* (1986b, 1987a) für das AB-ADP 0,5 h/ 100°C bzw. 2 h/ 95°C und für AB-ATP 70 h/ 50°C an.

¹³Falls man bei dem AMP- (GMP)-Derivat auf eine dünnschichtchromatographische Trennung verzichtet, da hier keine kontaminierenden Derivate entstehen können, und statt dessen die Probe zur Entfernung von AMP (GMP) mit alkalischer Phosphatase behandelt und nur über den Ionenaustauscher reinigt, so umgeht man die Schwierigkeiten, die eventuell mit der Silicagel-Chromatographie verbunden sind. Der Nachteil ist, daß das so gewonnene Derivat möglicherweise durch geladene Nebenprodukte verunreinigt ist, die sonst bei der Dünnschichtchromatographie abgetrennt werden.

Nukleotid	charakt. Verhältnis d. opt.		Maxima der UV-Absorption [nm]	R _F -Wert
	Dichten [nm/nm]			
	290/260 (250)	355/260 (250)		
pHB-ATP	0,20	—	260	0,31
oHB-ATP	0,14	—	260	0,31
AB-ATP	0,20	1,75	256,355	0,33
AB-ADP	0,20	1,75	256,355	0,40
AB-AMP	0,19	1,75	256,355	0,46
ATP	<0,01	0	259	0,04
ADP	<0,01	0	259	0,10
AMP	<0,01	0	259	0,13
Ade	<0,01	0	259	0,51

pHB-GTP	0,36	—	256	0,30
oHB-GTP	0,27	—	253	0,30
AB-GTP	0,40	1,70	250,355	0,34
AB-GDP	0,40	1,70	250,355	0,42
AB-GMP	0,35	1,60	250,355	0,49
GTP	0,24	0	252	0,04
GMP	0,24	0	252	0,15
Gua	0,24	0	252	0,46

Tab. 1 Charakteristische Daten der Nukleotidderivate

Die Verhältnisse der optischen Dichten bei 290 nm und 355 nm zu denjenigen bei 260 nm (Adenosin-Derivate) bzw. 250 nm (Guanosin-Derivate) sind angegeben. Die 290/260- bzw. /250-Werte weichen bis zu $\pm 0,02$ von den angegebenen Werten ab, die 355/260- bzw. /250-Werte bis zu $\pm 0,1$. Die Maxima der UV-Absorption wurden aufgrund der schrittweisen Messung bei 245, 250, 253, 256, 259, 260, 263 nm bzw. 350, 355 und 360 nm ermittelt. Die Angaben der R_F-Werte beziehen sich auf das System Silicagel 60/ CH₃CN:H₂O (4:1); die Abweichung von den aufgeführten Werten beträgt $\pm 0,03$, in Einzelfällen bei kurzen Chromatographiezeiten kann sie auch größer sein. Für die Adenosin-Derivate sind die Daten auch von Grachev *et al.* (1986b) tabelliert. Zusätzlich sind dort noch R_F-Werte für ein anderes Fließmittel CHCl₃:CH₃OH:H₂O (4:4:1) (System 'B') und die charakteristische Verringerung des Verhältnisses 290/260 nach einer Reduktion mit 10 mM NaBH₄, 30 min, 20°C genannt. Im Fall der AB-Derivate verschwinden die Maxima bei 355 nm nach einer NaBH₄-Reduktion völlig, so daß 355/260- bzw. 355/250-Verhältnisse kleiner als 0,05 gemessen werden. Die O.D.-Verhältnisse der nicht derivatisierten Nukleotide wurden P-L Biochemicals (1973) entnommen.

6. TRENNMETHODEN

6.1. Gelelektrophoresen

6.1.1. 25% Polyacrylamid-Sequenzgel

Eine Gellösung, die 25% Acrylamid, 0,87% N,N'-Methylenbisacrylamid, 7 M Harnstoff, 50 mM Tris-Borat pH 8,3 und 1 mM EDTA enthält (25 g Acrylamid, 0,87 g N,N'-Methylenbisacrylamid, 42 g Harnstoff, 10 ml 10x Tris-Borat-EDTA-Puffer *ad* 100 ml), wurde nach Abnutschen durch einen Papierfilter und Entgasen zwischen zwei 42cm x 32cm großen Glasplatten mit 0,4 mm Abstand polymerisiert (nach Maniatis *et al.*, 1982). Nach dem Eingießen der Lösung wurden die Gele mindestens vier Stunden lang vor dem Gebrauch in horizontaler Lage aufbewahrt. Die Proben wurden nach Zugabe von etwa 1 Volumen 8 M Harnstoff/ 0,05% Bromphenolblau durch 5minütiges Erhitzen auf 70-80°C und Abschrecken im Eisbad denaturiert. Falls diese Proben durch unterschiedliche Vorbehandlungen verschiedene Salzmengen enthielten, ist es für einen direkten Vergleich und eine gleichförmige Auftrennung äußerst wichtig, die Differenzmengen zu den entsprechenden Ansätzen zuzugeben. Dasselbe Produkt wird ansonsten in Gegenwart einer höheren Salzmenge retardiert.

Die Elektrophoresen erfolgten mit 50 mM Tris-Borat pH 8,3/ 1 mM EDTA als Elektrodenpuffer bei 800-2500 V bis das Bromphenolblau die gewünschten Strecken gewandert war (17-33 cm). Die nur 0,4 mm dicken Gele erlauben je nach Bedarf eine schnellere (2500 V unproblematisch), aber auch schärfere Trennung gegenüber dickeren Varianten.

6.1.2. SDS-Polyacrylamidgele

Die Zusammensetzung der Gele und des Elektrodenpuffers entsprach dem von Laemmli (1970) angegebenen System.

Das Sammelgel enthielt 4% Acrylamid, die Trenngele die jeweils an-

gegebene Konzentration (einheitlich 7,5%, 10%, 11% oder 15% oder als lineare Gradienten, s.u., 5-12%, 5-18% oder 6-18%). Die analytischen Gele wurden zwischen 15cm x 13,5cm großen Glasplatten mit 0,5 mm Abstand gegossen. Präpartive Gele waren 1,6 mm dick.

Beim Gießen von Gradientengelen wurden für die genannten Geldimensionen je 4,5 ml der beiden Konzentrationen verwendet. Die Dichte der höherprozentigen Lösung wurde durch 1/10 Volumenanteil an 80% Saccharose erhöht, so daß das Einfüllen der Gellösung von oben her mit Hilfe einer Peristaltikpumpe einfach und gleichmäßig möglich war.

Zur vereinfachten Handhabung wurden auf Anregung von Arkady Mustaev folgenden Stammlösungen hergestellt und bei 4°C aufbewahrt (in Klammern ist die Mindesthaltbarkeit angegeben):

Acrylamid	30 %	Acrylamid	(3-4 Wochen)
	0,8 %	N,N'-Methylenbis-acrylamid	
4x Sammelpuffer	500 mM	Tris·HCl pH 6,8	(mehrere Monate)
	0,4 %	SDS	
4x Trennpuffer	1500 mM	Tris·HCL pH 8,8	(mehrere Monate)
	0,4 %	SDS	
Saccharose	80 %	Saccharose	(mehrere Monate)
Katalysatoren A	10 %	N,N,N',N'-Tetra-methylethylen-diamin	(3-4 Wochen)
B	10 %	Na ₂ S ₂ O ₈	(2 Wochen)

Die Lösungen für einen 6-18% linearen Gradienten setzen sich wie folgt zusammen:

6%		18%
0,90 ml	Acrylamid	2,70 ml
1,125 ml	4x Trennpuffer	1,125 ml
-	80% Saccharose	0,45 ml
2,42 ml	H ₂ O	0,20 ml
je 30 µl	10% Katalysatoren A,B	je 15 µl

Die Proteinproben wurden nach Zugabe von 0,5 bis 1 Volumenanteil 6% SDS, 150 mM Tris·HCl pH 6,8, 20% Glycerin, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol (frisch zugesetzt) durch 3minütiges Erhitzen in kochendem Wasser denaturiert.

Die Elektrophorese erfolgte bei 70 V für 12-15 h bis die Bromphenolblau-Front das untere Ende des Gels erreichte und begann in den Elektrodenpuffer zu wandern.

8-25% Polyacrylamidgradient:

Das für die Auftrennung von tryptischen Peptiden in Fig. 11 verwendete Gel hatte eine etwas abweichende Zusammensetzung (nach Fling & Gregerson, 1986): 750 mM Tris·HCl pH 8,5 anstelle von 375 mM Tris·HCl pH 8,8 im Trenngel 50 mM Tris·HCl pH 8,5/ 190 mM Glycin/ 0,1% SDS als Laufpuffer. 50% Acrylamid/Bisacrylamid (37:1) diente als Stammlösung. Die Länge des Trenngels betrug 36 cm.

6.1.3. Agarose-Gele

Agarose-Gele zur Trennung von Nukleinsäuren wurden wie von Maniatis *et al.* (1982) beschrieben mit 50 mM Tris-Borat pH 8,3/ 1 mM EDTA/ ca. 0,1 µg/ml Ethidiumbromid als Laufpuffer verwendet.

6.2. Dünnschichtchromatographie

Alle Dünnschichtchromatographien wurden mit aufsteigenden Lösungsmitteln durchgeführt. Bei der Chromatographie von radioaktiven Proben wurden zusätzlich je 10-25 µMol einer oder mehrerer unmarkierter Referenzproben auf den Startpunkt aufgetragen und nach dem Lauf im UV-Licht durch ihre Absorption(en) lokalisiert.

Im Fall der PEI-Cellulose-Chromatographien wurden häufig die relativen Mobilitäten der aufgetrennten Produkte nicht auf die Fließmittelfront (R_F -Wert) bezogen, sondern auf einen internen Standard, nämlich ApU. Diese, R_{AU} -Werte genannten, Angaben konnte man besser vergleichen und reproduzieren.

6.2.1. Silicagel 60 F254

$\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$ (4:1) (Grachev *et al.*, 1986b)

Mit diesem Laufmittel wurden die Adenosin- und Guanosin-Derivate aufgetrennt. R_F -Werte sind in Tab. I angegeben.

Isopropanol : NH_3 : H_2O (6:3:1) (Hanna & Meares, 1983a)

Dieses System wurde zum Nachweis von ApU eingesetzt. Der R_F -Wert beträgt 0,7.

6.2.2. Whatman 3MM

0,1 M Na-Phosphat pH 6,8 : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: n-Propanol (100:60:2 v/w/v) (P-L Biochemicals, 1973) (Fließmittel III)

Das System wurde zur Auftrennung und zum Nachweis von pppApU bei der abortiven Initiation mit ATP und $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$, und von ApU und P_i verwendet. Die Laufstrecke betrug stets 17,5 cm. P_i wanderte mit der Front, da Phosphat Bestandteil des Elutionsmittels ist; der R_F -Wert von UTP ist 0,8, von pppApU 0,34 und ApU 0,10.

Höhere Oligonukleotide wandern langsamer, bzw. bleiben an der Auftragsstelle liegen; aus diesem Grund eignet sich das System auch zur Bestimmung der RNA Polymerase Enzymaktivität (s. 8.).

6.2.3. PRI-Cellulose F254

Die Laufstrecke betrug in allen Fällen 18,5 cm bis zum oberen Ende des Chromatographiestreifens (2cm x 20cm mit einer Probe oder ein größeres Blatt mit mehreren Proben). Die R_F - oder R_{Au} -Werte werden aufgrund der Wanderung von unmarkierten Referenzverbindungen bzw. im Fall von P_i , ApUpA und ApUpU mit Hilfe von radioaktiv markierten Vergleichsverbindungen angegeben:

0,16 M LiCl (Randerath & Randerath, 1967)

Mit diesem Elutionsmittel wurden Dinukleosidmonophosphate ApN unterschieden; darüberhinaus wurde das System zur Charakterisierung von Di- und Trinukleotiden, bzw. deren Spaltprodukten eingesetzt.

0,5 M NaHCOO pH 3,6 (Randerath & Randerath, 1967)

Dieses Laufmittel wurde bei der Produktcharakterisierung von Di- und Trinukleotiden meist parallel verwendet, um eindeutige Aussagen durch den Vergleich mit 0,16 M LiCl erhaltenen Daten treffen zu können. Außerdem werden die vier 3'-NMP gut getrennt, weshalb das System auch bei der Charakterisierung der Hydrolyseprodukte von RNA eingesetzt wurde.

In diesen beiden Systemen beobachtet man folgende R_F -Werte (jeweils 0,16 M LiCl / 0,5 M NaHCOO pH 3,6):

ApA (0,38 / -)	ApC (0,46 / -)	ApG (0,34 Angabe nach Randerath & Randerath (1967)/ -)	ApU (0,54 / 0,63)
-----------------	-----------------	---	-------------------

bzw. auf ApU bezogene R_{AU} -Werte:

ApApU (0,55 / 0,82)	ApUpA (0,41 / 0,80)	ApUpU (0,65 / 0,98)
ApUpG (0,34 / 0,64)	ApCpC (0,57 / 0,93)	
ApUp (0,04 / 0,48)	Pi (0,21 / 0,62)	
pA (0,23 / 1,00)	pU (0,45 / 1,14)	
Ap (0,20 / 0,82)	Cp (- / 1,13)	Gp (- / 0,62)
Up (- / 1,03)	pAp (0,02 / 0,14)	ppA (0,04 / 0,12)

6.3. Elution aus Gelen

6.3.1. Elektroelution von Polypeptiden aus SDS-Polyacrylamidgelen

Die gewünschten Proteinbanden waren immer radioaktiv markiert; nach der Lokalisierung durch Autoradiographie des unbehandelten SDS-Polyacrylamidgels bei 5°C konnte man die gewünschte Gelzone ausschneiden und die richtige und vollständige Entfernung durch eine zweite Autoradiographie kontrollieren.

Das Polypeptid wurde nach Jacobs und Clad (1986) und Herstellerangabe in einer Elutionsvorrichtung von Schleicher & Schüll (Biotrap) elektroeluiert. Als Puffer diente der Elektrodenpuffer Tris-Glycin-SDS der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Die Elution erfolgte im Kühlraum während 15-18 h bei 180-200 V. Zuletzt wurde die Spannung für 15-20 s umgepolt (200 V).

Die Biotrap wurde ohne Erschütterung aus dem Elektrophoresebehälter genommen und die Lösung aus der Kammer zwischen den beiden Membranen vorsichtig herauspipettiert (300-550 µl). Dieser Prozeß, auch das Einfüllen der Pufferhöhe zu Beginn der Elution, kann bei seitlicher Betrachtung sehr gut verfolgt werden, wenn man die Biotrap von oben anstrahlt.

Die Ausbeute jeder Elution ließ sich dadurch abschätzen, daß die Radioaktivität sowohl des Eluats als auch beider Membranen und der Gelstücke jeweils in Eppendorfgläsern umgeben von Toluol-Szintillationsflüssigkeit im ^{32}P -Kanal gemessen wurde; der zurückbleibende Puffer in der Elutionsvorrichtung war kaum radioaktiv. Der Anteil des Eluats an der Summe der Radioaktivität betrug bei dieser groben Abschätzung 80-95%.

Zur Konzentrierung oder zur Entfernung von SDS wurde das Polypeptid mit 4 Volumen Aceton (-20°C) 1 h lang bei -20°C gefällt und einmal mit eiskaltem 80% Aceton gewaschen (Hager & Burgess, 1980). Bei dem sichtbaren weißen Präzipitat handelt es sich um Glycin aus dem Elutionspuffer. Das gewaschene Präzipitat wurde nach dem vorsichtigen Abpipettieren von Aceton an Luft getrocknet.

6.3.2. Elektroelution von DNA-Fragmenten

Das zu trennende DNA-Fragment-Gemisch wurde über ein Agarosegel (s. 6.1.3.) im Kühlraum aufgetrennt; direkt vor der gewünschten Bande (Ethidium-Fluoreszenz) wurde mit einem Skalpell eine 2-3 mm breite Vertiefung herausgeschnitten und diese Kammer nach unten und in Elektrophorese-Richtung durch Einpassen eines Dialysemembran-Stücks abgedichtet. Die Elektrophorese wurde bei gleicher Höhe von Gel und umgebendem Puffer fortgesetzt, wobei sich die DNA an der Membran sammelte. Die Spannung wurde 20 s lang umgepolt und die Lösung aus der Vertiefung pipettiert. Das Sammeln und Entfernen der DNA kann im UV-Licht kontrolliert werden.

Die Lösung wurde mehrmals mit n-Butanol extrahiert und die DNA mit 3 Volumen Ethanol gefällt.

6.3.3. Elution nach Dünnschichtchromatographie

Die Elution von Nukleotidderivaten mit H_2O aus Silicagel 60 ist in 5.4. beschrieben.

Zur Charakterisierung von radioaktiven Dinukleosidmonophosphaten oder Trinukleosiddiphosphaten wurden diese nach der Auftrennung im System PEI-Cellulose / 0,16 M LiCl durch eine Autoradiographie lokalisiert, die entsprechende Produktzone mit einem Spatel abgekratzt und das Material 3-4mal mit je 250-400 μ l 1 M TEAB pH 8 in einem Eppendorfgeläß eluiert. Das Eluat wurde im Vakuum zur Trockene eingengt und das flüchtige TEAB entfernt (*speed vac concentrator*).

Auf die gleiche Weise wurden präparativ auch radioaktive Vergleichsverbindungen (A^*pU , A^*pU^*pU , ApU^*pA) gereinigt.

7. NACHWEISE UND DOKUMENTATION

7.1. Proteine

7.1.1. Proteinfärbung in SDS-Polyacrylamidgelen

Färbung mit Coomassie G250

Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel, das zur Abdichtung verwendete Fett und eine eventuelle Beschriftung auf der Glasplatte sorgfältig (Methanol) entfernt. Das Trenngel löste sich beim Schwenken in der 0,25% Coomassie-Färbelösung (in Methanol : Eisessig : H_2O 5:1:5; Weber & Osborn, 1969) von der Glasplatte. Innerhalb von 30-50 min erfolgte die Fixierung und Färbung der Proteinbanden unter gelegentlichem Schwenken.

Danach wurde das Gel mit Hilfe der Glasplatte herausgehoben und in einer zweiten Schale mit 7,5% Essigsäure, 5% Methanol (Weber & Osborn, 1969; mehrere Wechsel, 1-3 h) auf einem Schütteltisch entfärbt. Beim letzten Wechsel der Entfärbelösung wurde etwa 2% Gly-

cerin zugegeben und das Gel danach einige Sekunden in Wasser geschwenkt, um überschüssige, die Vakuumpumpe korrodierende Essigsäure zu entfernen. Das feuchte Gel haftet an einem von oben aufgelegten Whatman 3MM-Papier und kann aus der Schale genommen und im Geltrockner (30 min) entwässert werden.

Färbung mit Silber

Die Säuberung des Trenngels und die abschließende Trocknung erfolgte wie für die Coomassie-Färbung beschrieben. Das Verfahren zur Silberfärbung ist von Bürk *et al.* (1983) beschrieben. Das Gel wurde nach der Elektrophorese 30 min in Methanol : Eisessig : H₂O (5:1:5) und 15 min in 15% Methanol geschwenkt. Die Polypeptide wurden anschließend 30 min mit 150 ml 10% Glutaraldehyd kovalent mit der Gelmatrix vernetzt, das Gel dreimal mit H₂O gespült und mindestens 45 min mit 6-8 Wechseln (oder über Nacht) in frischem H₂O geschüttelt. Äußerst wichtig für einen guten Kontrast gegenüber dem Gelhintergrund ist die vollständige Entfernung von Glutaraldehyd (Geruch). Darauf erfolgte eine 15minutige Behandlung mit der beschriebenen ammoniakalischen Silbernitrat-Lösung; überschüssiges, nicht komplexiertes Silber wurde durch ein kurzes Spülen und drei Wechsel in frisches H₂O (je 5 min) entfernt. Die Entwicklung mit Formaldehyd (100 µl 37% Formaldehyd-Lösung in 200 ml 50 mg/l Citronensäure) bis zur gewünschten Intensität und das Beenden mit Methylamin (100 µl 35% Methylamin in 500 mg/l Citronensäure) wurden wie angegeben durchgeführt. Vor dem Trocknen wurde das Gel noch in H₂O (mit Glycerin-Zusatz) gewaschen.

Die in Fig. 21 gezeigten Proteinbanden wurden im Laboratorium von L. Rothman-Denes nach der dort verwendeten Methode nach Merril *et al.* (1981) mit Silber gefärbt.

7.1.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Qualitative Bestimmung

Während der Anreicherung der Weizenkeim RNA Polymerase II wurde die Elution von Protein von den verwendeten Säulen lediglich durch Messung der optischen Dichte bei 280 nm verfolgt.

Quantitative Bestimmung

Die quantitative Bestimmung beruht auf der von Lowry *et al.* (1951) verbesserten Methode mit Hilfe der Reduktion des Folin-Ciocalteu-Reagens.

Die Proteinlösungen wurden nach Bensadoun und Weinstein (1976) in Gegenwart von 0,125 µg/ml Na-deoxycholat durch 6% Trichloressigsäure bei Raumtemperatur gefällt (15 min stehenlassen, 5 min zentrifugieren), um mit dem nachfolgenden Test interferierende Verbindungen zu entfernen.

Die anschließende Farbreaktion wurde nach Hess *et al.* (1978) durchgeführt; allerdings wurden anstelle der schrittweisen Addition von H₂O, 2 N NaOH, Lösung A (0,2 g K,Na-Tartrat, 10 g Na₂CO₃, 55 ml 1 N NaOH *ad* 100 ml) und Lösung B (2 g K,Na-Tartrat, 1 g CuSO₄·5H₂O *ad* 90 ml, + 10 ml 1 N NaOH) diese vier Komponenten in den angegebenen Anteilen (150:100:180:20) frisch vermischt und diese Lösung zum Trichloressigsäure-Präzipitat gegeben.

Die Proben wurden zum Auflösen des Niederschlags geschwenkt und nach wenigen Minuten kurz zentrifugiert. In 1-2minütigem Abstand, der aber möglichst konstant für eine Reihe sein sollte, wurden zwei 300 µl-Portionen von frisch mit H₂O (2 Teile) verdünntem käuflichem Folin-Ciocalteu-Reagens (1 Teil) zugesetzt und jeweils sofort gut durchmischt.

Nach 45 ± 5 min bei Raumtemperatur (lichtgeschützt) wurde die optische Dichte bei 720 nm bestimmt.

Parallel zu den unbekannten Proben wurde jeweils die Vergleichsbestimmung mit bekannten Mengen Rinderserumalbumin durchgeführt (2 bis 50 µg).

7.2. Nukleotide und Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleotidlösungen wurde spektrophotometrisch durch die Bestimmung der optischen Dichten bei den von Maniatis *et al.* (1982) angegebenen Wellenlängen mit Hilfe der molaren Absorptionskoeffizienten ermittelt.

Die Konzentrationsbestimmung für DNA und RNA erfolgte ebenfalls spektrophotometrisch, wobei die von Maniatis *et al.* (1982) angegebenen Umrechnungsfaktoren benutzt wurden.

Für synthetische Copolymere (poly[d(A-T)]) wurde ungeachtet der nicht statistischen Basenzusammensetzung der für DNA genannte Wert (1 O.D._{260nm} = 50 µg/ml) benutzt.

Käufliche Dinukleosidmonophosphate oder Trinukleosiddiphosphate wurden entsprechend den Herstellermengenangaben in H₂O gelöst, um 10 oder 25 mM Stammlösungen zu erhalten.

Qualitativ wurden Nukleotide durch ihre UV-Absorption nach Dünnschicht- oder Papier-Chromatographie nachgewiesen.

In Agarosegelen elektrophoretisch getrennte DNA oder RNA war aufgrund der Ethidiumbromid-Fluoreszenz sichtbar (Maniatis *et al.*, 1982).

7.3. Radioaktivität

7.3.1. Autoradiographie

Nach der Trennung radioaktiver Verbindungen in SDS-Polyacrylamidgelen (unbehandelte oder getrocknete Gele), in Harnstoff-Polyacrylamid-Gelen (unbehandelt bei -70°C eingefroren) oder durch Chromatographie (unter Rotlicht getrocknet) wurden diese durch Autoradiographie auf einem Röntgenfilm lokalisiert. Die Belichtung der Filme erfolgte bei Raumtemperatur oder bei -70°C mit oder ohne Verstärkerfolie. Eine Sensibilisierung der Filme durch Vorbelichtung erfolgte in keinem Fall.

Falls angegeben, wurden derartige Autoradiogramme mit Hilfe eines Hirschmann elscript 400 Densitometers ausgewertet und dargestellt oder die Signalstärken zur quantitativen Abschätzung herangezogen.

7.3.2. Quantitative Bestimmung

Chromatographisch aufgetrennte, radioaktiv markierte Proben wurden auch durch automatisches Abtasten mit einem Zählrohr (Berthold) lokalisiert, gegebenenfalls quantitativ ausgewertet und als ortsabhängige Kurven dargestellt.

Ansonsten erfolgte die quantitative Radioaktivitätsbestimmung von Chromatogramm-Abschnitten, gefärbten, ausgeschnittenen Proteinbanden oder Whatman 3MM-Papierstücken nach Trocknung unter Rotlicht durch 1 bis 10minutige Szintillationsmessung in Gegenwart von Toluol-Szintillationsflüssigkeit mit 4 g/l 2,5-Diphenyloxazol und 0,05 g/l 1,4-Di-[2-(5-phenyloxazolyl)]benzol.

Auf Whatman 3MM aufgetragen wurden verschiedene Mengen einer definierten Verdünnung (z.B. 1:1000) der kommerziellen [α - 32 P]NTP-Präparationen gemessen, um deren spezifische Radioaktivität zu überprüfen.

8. AKTIVITÄTSTEST FÜR RNA POLYMERASE

Die Bestimmung der Enzymaktivität der Weizenkeim RNA Polymerase erfolgte nach Burgess und Jendrisak (1975) in einem Reaktionsvolumen von 20 μ l (bei Enzymanreicherung 25 μ l; 10 mM Tris·HCl pH 7,9, 20 mM $MgCl_2$, 50 mM $(NH_4)_2SO_4$ ¹, 0,5 mg/ml Rinderserumalbumin und getrennt 1 mM $MnCl_2$ wurden als 10fach konzentrierte Lösungen eingesetzt) mit 200 μ g/ml denaturierter Kalbsthymus-DNA als Matrize und je 400 μ M ATP, CTP und GTP und 0,4 μ M [α - 32 P]UTP (ca. 50 Ci/mMol) als Substrate. Ein Aktivitätstest mit poly[d(A-T)] als Matrize ist eigens im Anhang beschrieben.

Nach einer 15minutigen Inkubation bei 25°C oder 30°C wurden die Ansätze in Eiswasser gestoppt.

¹Bei Säulenfraktionen mit hohem $(NH_4)_2SO_4$ -Gehalt wurde kein oder weniger zusätzliches $(NH_4)_2SO_4$ zugegeben.

Zur schnellen halbquantitativen Aktivitätsbestimmung wurde ein Aliquot eines Ansatzes auf ein kleines Stück (etwa 1cm x 2cm) Whatman 3MM Papier pipettiert und dieses in einen Behälter mit eisgekühltem 10 mM $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ / 5% Trichloressigsäure-Lösung gegeben, wodurch die RNA direkt auf dem Papier ausgefällt wird. Nach mehrmaligem Schwenken (etwa 5-10 min) wurde dieser Vorgang dreimal mit jeweils frischer, bzw. weniger verunreinigter Trichloressigsäure-Lösung zur Entfernung von löslichem, nicht eingebautem Substrat wiederholt. Vier Gefäße wurden in einer festgelegten Reihenfolge verwendet, wobei nach jeder Testreihe der Inhalt des jeweils ersten, am stärksten kontaminierten Gefäßes zum radioaktiven Abfall gegeben wurde und dieses Gefäß mit frischer Lösung beim nächsten Test zur letzten Waschung benutzt wurde (nach Grachev & Zaychikov, 1974). Die Radioaktivität auf den getrockneten Papieren wurde durch Szintillationsmessung bestimmt.

Zur quantitativen Bestimmung des Einbaus von ^{32}P UMP wurde ein Aliquot eines Ansatzes im System Whatman 3MM/ Fließmittel III chromatographiert. Dabei genügt zur Abtrennung des nicht eingebauten Substrats von der an der Auftragsstelle zurückbleibenden höhermolekularen RNA eine Laufstrecke von insgesamt 6-8 cm. Das getrocknete Chromatogramm wurde in Streifen zerschnitten, im Szintillationszähler gemessen und die Radioaktivität an der Auftragsstelle (1cm-Streifen $\pm$ 0,5 cm von der Auftragslinie) als Anteil der Gesamtradioaktivität auf dem Chromatogramm (entspricht dem Ansatz) quantitativ angegeben. Anhand der bekannten Menge von eingesetztem $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ (z.B. 25 μl -Ansatz $\cdot$ 0,4 μM = 10 pMol) konnte die eingebaute Menge (Mol) von ^{32}P UMP errechnet werden.

Die Aktivitätstests der Tabakzellkernextrakte erfolgte in Bezug auf die Matrizen-, Nukleosidtriphosphat-, MnCl_2 - und MgCl_2 -Konzentrationen unter den gleichen Bedingungen; abweichend - aufgrund des Aufschlusses - waren 10 mM HEPES-NaOH pH 7,7, 20% Glycerin, 60 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 mM DTT und 0,1 mM EDTA.

9. ANSÄTZE ZUR ABORTIVEN INITIATION

Die Transkriptionsansätze (15 oder 25 μ l) zur abortiven Initiation mit Weizenkeim RNA Polymerase II enthielten 0,9-2,3 μ g Enzym und dazu Plasmid-DNA oder DNA-Fragmente in einer Konzentration von etwa 7 nM oder 1 μ g poly[d(A-T)] als Matrize und wurden wie von Mosig *et al.* (1985) beschrieben in Gegenwart von 10 mM HEPES-NaOH pH 7,9, 60 mM KCl, 0,8 mM MnCl₂, 5% Glycerin, 0,25 mM DTT (Zugabe als 10x konzentrierte Stammlösung) durchgeführt. Die Konzentrationen und die jeweiligen Kombinationen der beiden Substrate sind bei den Experimenten angegeben; als Substrate dienten in dieser Arbeit: AMP, ATP und alle vier [α -³²P]NTP.

Die Inkubation erfolgte 2,5-4 h lang bei 37°C. Die Reaktionen wurden durch 3-5minütiges Erhitzen auf 70-80°C beendet und Aliquots papierchromatographisch (Whatman 3MM/ Fließmittel III, nur bei pppApU) oder gelelektrophoretisch (25% Sequenzgele) getrennt. Die auf Bromphenolblau bezogenen R_F-Werte bei der Gelelektrophorese in einem 25% Sequenzgel betragen für Dinukleosiddiphosphate und Dinukleosiddiphosphate etwa 1,25 bis 1,50 und für Dinukleosidmonophosphate etwa 0,80 bis 0,95 (eine genauere Analyse einzelner Verbindungen ist in Kap. 1.1.2. des Ergebnisteils ausgeführt; vgl. auch Fig. 1 und 2).

Die *primer*-unabhängige abortive Initiation der Hefe RNA Polymerase II wurde analog durchgeführt; die Veränderungen hinsichtlich der Salzkonzentrationen entsprechend der optimalen Aktivitätsbedingungen dieses Enzyms sind aus Fig. 4 ersichtlich.

Zur Dephosphorylierung der entstehenden Produkte und Substrate wurde ein Aliquot eines Ansatzes direkt 1 h bei Raumtemperatur mit etwa 0,5 U alkalischer Phosphatase (aus Kälberdarm) inkubiert; die anschließende Analyse erfolgte gelelektrophoretisch (s.o.) oder chromatographisch im System PEI-Cellulose / 0,16 M LiCl.

10. RADIOAKTIVE VERGLEICHsverbindungen

Radioaktiv markierte Vergleichsverbindungen wurden hergestellt, um bei Gelelektrophoresen definierte, in der Autoradiographie sichtbare Marker zu erhalten oder die Wanderungsgeschwindigkeiten kommerziell nicht erhältlicher Verbindungen zu bestimmen.

10.1. [^{32}P]Ap*U

An poly[d(A-T)] als Matrize erfolgt durch Weizenkeim RNA Polymerase II eine effiziente Dinukleotidsynthese von pApU (> 10% Einbau der Radioaktivität innerhalb von 3 h mit 2 $\mu\text{g}/20\ \mu\text{l}$ Polymerase) mit AMP und [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]UTP (je 200 μM) als Substrate. Durch eine anschließende Behandlung mit alkalischer Phosphatase erhält man [^{32}P]ApU.

Falls dies als Referenz bei einer Gelelektrophorese eingesetzt werden soll, ist eine Reinigung [^{32}P]P_i nicht notwendig, weil P_i unter den üblichen Elektrophoresebedingungen (Bromphenolblau $\geq 16\ \text{cm}$) aus dem Gel wandert. Ein gereinigtes Produkt [^{32}P]ApU kann einfach und schnell nach einer Auftrennung im System PEI-Cellulose / 0,16 M LiCl eluiert werden (s. 6.3.3.).

10.2. [^{32}P]ApU*pA

Ebenfalls an poly[d(A-T)] als Matrize erfolgt durch Weizenkeim RNA Polymerase II eine effiziente ApUpA-Synthese (> 75% Einbau der Radioaktivität innerhalb von 3 h mit 2 $\mu\text{g}/20\ \mu\text{l}$ Polymerase) in Gegenwart von ApU (500 μM) und [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]ATP (50 μM).

Der Ansatz kann direkt im System PEI-Cellulose / 0,16 M LiCl aufgetrennt werden. Die bei einem R_F-Wert von 0,22 eluierte Radioaktivität (s. 6.3.3.) erwies sich eindeutig als das gewünschte Produkt: es ist Phosphatase-resistent; nach RNase T2-Spaltung findet man [^{32}P]Up, nach RNase A [^{32}P]ApUp und darauf anschließender Phosphatase-Verdauung [^{32}P]P_i. Die Identifizierung der Spaltungsprodukte erfolgte mit Hilfe von unmarkierten Referenz-Verbindungen durch Chromatographie in PEI-Cellulose sowohl mit 0,16 M LiCl als auch mit 0,5 M NaHCOO pH 3,6 als Laufmittel.

10.3. [^{32}P]A*pU*pU

Die abortive Initiation von *Micrococcus luteus* RNA Polymerase mit ATP und [α - ^{32}P]UTP führt an T7 Dlll-DNA zur Synthese von pppA*pU und pppA*pU*pU im Verhältnis von etwa 2 : 1, d.h. der Einbau von [^{32}P]UMP ergibt gleiche Mengen an Radioaktivität in beiden Produkten (Weiss, 1985).

In einem Volumen von 100 μl (60 mM Tris·HCl pH 7,9, 80 mM KCl, 8 mM MgCl_2) wurden 0,1 μg *M. luteus* RNA Polymerase in Gegenwart von 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ T7 Dlll-DNA als Matrize und 1,25 mM ATP und 0,2 mM [α - ^{32}P]UTP (1,5 Ci/mMol) als Substrate 1 h bei 25°C inkubiert. Nach Verdauung mit alkalischer Phosphatase kann man den Ansatz direkt als ApU/ApUpU-Marker bei der Gelelektrophorese verwenden (vgl. z.B. Fig. 1 e).

ApUpU kann man auch in gereinigter Form nach einer Auftrennung im System PEI-Cellulose / 0,16 M LiCl und Elution der Radioaktivität mit einem R_f -Wert von 0,35 erhalten (s. 6.3.3.). Die Überprüfung dieses Produkts durch Spaltungen mit alkalischer Phosphatase (resistent), mit RNase T2 ([^{32}P]Ap und [^{32}P]Up im Verhältnis 1:1), mit RNase A ([^{32}P]ApUp) und mit RNase A und alkalischer Phosphatase ([^{32}P]ApU und [^{32}P]P_i im Verhältnis 1:1) ergab die angegebenen, durch Referenz-Verbindungen chromatographisch identifizierte Spaltungsprodukte.

10.4. [^{32}P]poly[r(A,U)]-Nukleotidleiter (2-40 Nukleotide)

Eine abortive Initiationsreaktion mit Weizenkeim RNA Polymerase II erzeugt bei verringerter Salzkonzentration (5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ anstelle von 60 mM KCl, Helmut Mosig, pers. Mitteilung) in Gegenwart von je 200 μM ATP und [α - ^{32}P]UTP an 2,7 μg pSS (Werr *et al.*, 1985; Mosig, 1988) als Matrize (3,5 h, 37°C) nicht nur ein pppApU als Hauptprodukt, sondern einen beträchtlichen Anteil an höhermolekularen, bei der Gelelektrophorese langsamer wandernden Produkten. Dabei handelt es sich, wie man nach einer Auftrennung des Ansatzes in einem 25% Sequenzgel erkennt (Fig. 1 a,c), um Produkte, die

jeweils um ein Nukleotid verlängert sind. Die Logarithmen der Nukleotidlängen, beginnend mit dem Dinukleosiddiphosphat bis zu einem 40mer zeigen nämlich eine lineare Abhängigkeit von der Wanderungsstrecke² (ohne Belege).

Die parallel aufgetragenen 5'-dephosphorylierten Produkte (Fig. 1 b,d) haben wegen der abgespaltenen Phosphatladungen eine verringerte Mobilität gegenüber den Oligonukleotiden mit 5'-Phosphaten. Bei den niedrigen dephosphorylierten Oligonukleotiden treten dabei jedoch Unregelmäßigkeiten in der Mobilität auf; das Dinukleosidmonophosphat wandert langsamer als das Trinukleosiddiphosphat und dieses wiederum langsamer als das Tetranukleosidtriphosphat (Fig. 1 e; Kap. 1.1.2., Ergebnisteil; Weiss, 1985; Honda *et al.*, 1986). Der Grund dafür ist die starke Zunahme der negativen Ladung der Phosphatgruppen/ Nukleotid (0,5 beim Dinukleotid, 0,67 beim Trinukleotid, 0,75 beim Tetranukleotid, usw.)³, d.h. es tritt ein gegenläufiger Effekt zur Trennung nach den Nukleotidlängen auf, die aber bei höheren Oligonukleotiden offensichtlich wieder allein entscheidend ist (Fig. 1).

Durch die versetzte Auftragung der beiden Oligonukleotid-Reihen (Fig. 1 a,b vs. c,d) kann man dasjenige dephosphorylierte Produkt als ein Octanukleosidheptaphosphat identifizieren, das als erstes eindeutig vom ApU-Signal unterscheidbar ist und am Beginn der wieder allein nach der Nukleotidlänge aufgetrennten Reihe steht. Damit kann man auch alle höheren Glieder der dephosphorylierten Reihe in ihrer Länge eindeutig benennen und als Größenmarker verwenden (vgl. Fig. 26, Ergebnisteil). Alle Produkte größer als ApU, aber kleiner oder gleich einem Heptamer wandern damit schneller oder gleich wie ApU (Fig. 1).

²Vom 4mer bis zum 16mer der $pppA(pN)_x$ -Reihe ($N = A,U; x \geq 1$) ist die lineare Abhängigkeit streng erfüllt, das Tri- und Dimer wandern mit leicht erhöhter Mobilität, während höhere Oligomere eine leichte Retardierung zeigen.

³Bei 5'-phosphorylierten Oligonukleotiden nimmt dagegen diese Ladungsdichte bei steigender Nukleotidzahl ab; z.B. 2,50 für das Dinukleosiddiphosphat, 2,00 für das Trinukleosiddiphosphat, usw..

Fig. 1 Trennung von Oligoribonukleotiden der Ketten $pppA(pN)_x$ und $A(pN)_x$ mit $N = A, U$ und $x \geq 1$ in einem 25% Sequenzgel

Die Proben in a und b wurden zeitlich versetzt zu denjenigen in c, d und e aufgetragen, so daß die Wanderungstrecke von Bromphenolblau in a, b 20 cm und c, d, e 33 cm betrug.

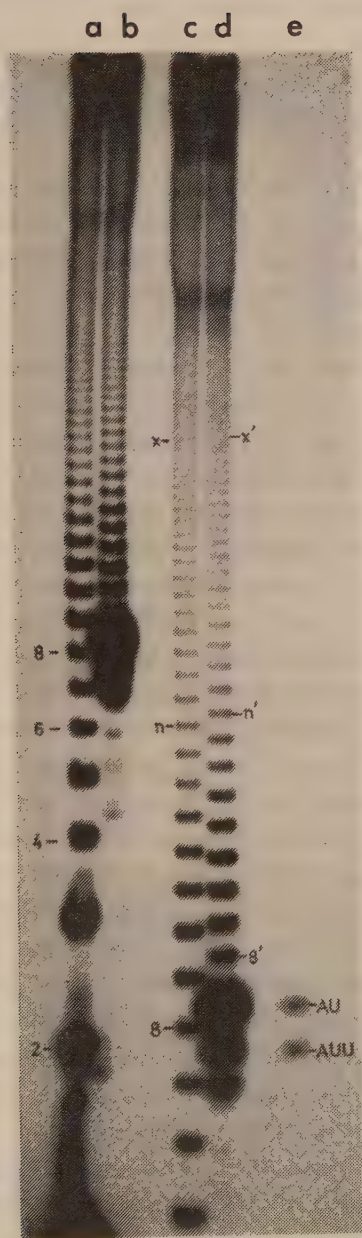
a, c Abortive Initiationsreaktionen unter den im Text beschriebenen Bedingungen

b, d wie a, c, aber mit alkalischer Phosphatase verdaut

e Gemisch aus A^*pU und A^*pU^*pU als Vergleich (s. 10. S.)

Bei Oligonukleotiden mit mehr als etwa 30 Nukleotiden sollte die Mobilität des dephosphorylierten Produkts nur wenig geringer sein als diejenige des gleichen Produkts mit 5' Phosphaten. Dies ist auch durch die Annäherung der Bandenmuster bei höheren Gliedern offensichtlich der Fall. Greift man willkürlich eine mit x bezeichnete Bande in Bahn c heraus, die aufgrund der Anzahl der Banden sicher größer als 30 Nukleotide ist, so ist die entsprechende Bande in Bahn d mit x' markiert. Durch schrittweise Subtraktion von jeweils einem Nukleotid erhält man die gleich langen Produkte n und n' und schließlich die Banden S und S'. Die Bande S in Bahn c ist nach dem Bandenmuster eindeutig identisch mit Bande S in Bahn a, wobei es sich um das Octamer $pppA(pN)_8$ handelt; die Position des ersten Gliedes $pppApU$ in Bahn a ist durch die bekannte Mobilität dieser Verbindung (auf Bromphenolblau oder ApU in Bahn e bezogene R_F -Werte) gesichert.

Bei den mit n und n' bezeichneten Banden handelt es sich also um die 16mere, bei den mit x und x' bezeichneten um die 35mere.



11. ANSÄTZE ZUR AFFINITÄTSMARKIERUNG

11.1. Analytische Ansätze

Die einzelnen Schritte zur Affinitätsmarkierung sind in der Einleitung und im Ergebnisteil ausführlich erläutert.

Experimentell wichtig - auch für eine mögliche Anwendung auf andere Systeme - sind die folgenden Punkte:

11.1.1. Inkubation mit dem (Aldehyd-)Derivat

Wichtige Parameter bei diesem ersten Schritt, der Inkubation einer Polymerase mit einem Nukleotidderivat, sind die Konzentrationen des Derivats, des Enzyms und der Matrize. Davon hängt auch der Nachweis einer Markierung bzw. ihre Stärke ab.

Im Fall der Weizenkeim RNA Polymerase II wurde eine intensivere Markierung erzielt, wenn hier keine Matrize zugegeben wurde, andere Systeme waren indifferent gegenüber dem Zeitpunkt der Matrizen-Zugabe oder zeigten sogar eine schwächere Markierung.

Die Puffer- und Salzkonzentrationen entsprachen den ansonsten für die jeweils untersuchten Enzyme zur Transkription oder Aktivitätsbestimmung verwendeten Bedingungen und wurden als 1/10 Volumenanteil einer 10x Pufferlösung (vgl. Tab. 2) zugesetzt. Lediglich Tris·HCl wurde meist durch HEPES·NaOH ersetzt⁵, um eine mögliche Beeinflussung der Imin-Bildung durch das Aldehyd-Reagens zu vermeiden; derartige denkbare Wechselwirkungen mit anderen Aminen, SH-Reagentien oder allgemein mit Nukleophilen sollten in die Überlegungen bei einem Fehlschlag eines Markierungsexperiments einbezogen werden. Darüberhinaus kann eine Erhöhung des pH-Wertes zu einer Verstärkung der Markierung führen (s. Kap. 2.1.5.1., Ergebnisteil).

Die Temperatur (30 oder 37°C) richtete sich nach den Optima der untersuchten Enzyme. Im allgemeinen wurde 15-30 min mit dem Derivat

⁵Dies führte in keinem Fall zu einer Verringerung der Enzymaktivität.

vat inkubiert; die Reaktion scheint aber sehr schnell abzulaufen (vgl. Kap. 2.1.5.1. und 2.2.2., Ergebnisteil), so daß auch weit kürzere Zeiten genügen. Das ist besonders bei instabilen Präparationen vorteilhaft. Die Reaktionen wurden in einem abgedunkelten Wasserbad inkubiert.

11.1.2. NaBH_4 -Reduktion

Allgemein sollte dieser Schritt, der zur irreversiblen Fixierung der gebundenen und zur Inaktivierung der überschüssigen Aldehyd-Derivate führt, möglichst schonend, d.h. mit niedriger NaBH_4 -Konzentration bei tiefer Temperatur erfolgen.

Während bei Weizenkeim RNA Polymerase II innerhalb eines großen Bereichs an 1-10 mM NaBH_4 , 0-37°C keine entscheidende Veränderung der Markierung auftritt, konnte in anderen Fällen (N4 RNA Polymerasen, T7 RNA Polymerase) nur mit verringerten Konzentrationen von 0,5-1 mM NaBH_4 bei 0-20°C eine Markierung erzielt oder optimiert werden.

Die NaBH_4 -Lösung in H_2O wurde unmittelbar vor Zugabe als 100 oder 200 mM Lösung hergestellt (3,8 bzw. 7,6 mg/ml NaBH_4) und so verdünnt, daß 1 μl der Verdünnung die gewünschte Endkonzentration im Ansatz ergab.

11.1.3. Bildung von Phosphodiesterbindungen mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$

In diesem Schritt wurde die Matrize, wenn sie bei der Inkubation mit dem Derivat fehlte, ein jeweils angegebenes $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$ und für besondere Untersuchungen ein weiteres Nukleosidtriphosphat zugegeben.

Die $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$ (400 bis 3000 Ci/mMol) wurden meist ohne oder nur mit geringem Zusatz des entsprechenden, unmarkierten NTP verwendet, um eine möglichst hohe spezifische Radioaktivität zu erhalten und auf diese Weise ein intensives Signal zu erzielen. Die Konzentration der $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$ lag dadurch bei 0,1 bis 1 μM . Für die Zahl der tatsächlich markierten Enzymmoleküle ist jedoch die $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$ -Konzentration von Bedeutung; im Fall von Weizenkeim RNA

Polymerase II bzw. von T7 RNA Polymerase ergaben sich erst ab 0,5 μM [α - ^{32}P]UTP bzw. [α - ^{32}P]GTP in dieser Hinsicht optimale Markierungen.

Die Inkubationstemperatur richtete sich wieder nach den optimalen Bedingungen für die untersuchten Enzyme; die Dauer betrug 4 bis 30 min.

11.1.4. Abbrechen der Reaktion, anschließende Verdauungen und Denaturierung

Die Reaktionen wurden durch Abkühlen der Reaktionsmischung im Eisbad beendet. Eine anschließende Verdauung mit RNase, DNase I oder Proteinase K wurde wie jeweils angegeben durchgeführt. Handelte es sich dabei um Kontrollreaktionen zum Beweis der Spezifität der Affinitätsmarkierung, so wurde eine entsprechend vervielfacht angesetzte Markierungsreaktion genau aliquotiert und mit dem genannten Enzym behandelt oder unverdaut belassen.

Da die Taschen der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele nur ein Volumen von etwa 12-15 μl aufnehmen können, wurden die im Eisbad abgekühlten Ansätze 3-7 min lang im Vakuum (*speed vac concentrator*) auf 4-9 μl eingeeengt, mit 4-6 μl Denaturierungspuffer (s. 6.1.2.) versetzt und 3 min lang in kochendem Wasser inkubiert.

11.1.5. Variationen

Die in allen Reaktionen gleichen Komponenten (z.B. Enzym, Puffer, H_2O) wurden getrennt gemischt und dann in einem einzigen Pipettierschritt in die einzelnen Gefäße verteilt, um möglichst gleiche Bedingungen zu erzielen. Zur Durchführung von Kontrollexperimenten wurden die jeweils genannten Komponenten aus der Inkubationsmischung weggelassen (Matrize, Derivat, usw.) oder zusätzlich zugegeben (α -Amanitin, Nukleotide, usw.).

Die Umkehr der Reihenfolge der Schritte, die zu einer Polymerisationsreaktion durch die Weizenkeim RNA Polymerase II vor dem Reduktionsschritt führte ist in Kap. 3.1. des Ergebnisteiles beschrieben.

11.1.6. Kontrollkriterien für eine funktionelle Affinitätsmarkierung

Die Spezifität der Markierung in Bezug auf die Umsetzung mit dem Nukleotidderivat wird durch das Weglassen des Derivats oder des Reduktionsschrittes zu seiner irreversiblen Fixierung oder durch den Ersatz des Derivats durch das entsprechende unmodifizierte Nukleotid kontrolliert. In allen diesen Fällen durfte es zu keiner Markierung kommen.

Aus der Beobachtung, daß die gefundene radioaktive Bande Protease-sensitiv, aber resistent gegenüber DNase I und RNasen⁶ ist, kann geschlossen werden, daß es sich tatsächlich um ein markiertes Polypeptid handelte.

Die Überprüfung der Abhängigkeit von der Polymeraseaktivität des untersuchten Enzyms erfolgt durch Weglassen von dafür essentiellen Faktoren (z.B. Matrize, Metallion, usw.) oder durch Zusatz von Hemmstoffen (z.B. α -Amanitin, usw.), wobei keine oder eine geschwächte Markierung gefunden werden soll.

11.2. Präparative Ansätze

Präparative Ansätze mit Weizenkeim und Hefe RNA Polymerase II wurden mit 20-40 μ g Enzym in einem Volumen von 100-120 μ l unter den für die analytischen Experimente angegebenen Bedingungen durchgeführt. Die im Eisbad abgekühlten Inkubationsmischungen wurden im Vakuum auf die Hälfte eingengt, mit 40-50 μ l Denaturierungspuffer (s. 6.1.2.) versetzt und 3-4 min lang im Wasserbad gekocht. Die in Kapitel 3.2. des Ergebnisteils beschriebenen Versuche erfolgten analog, aber nach der dort veränderten Reaktionsfolge. Nach der Trennung über ein 7,5% SDS-Polyacrylamidgel wurde(n) die durch Autoradiographie lokalisierte(n) markierte(n) Bande(n) elektroeluiert (s. 6.3.1.).

⁶Die Resistenz gegenüber RNasen ist allerdings keine zwingende Forderung; das gebundene Oligonukleotid könnte so gespalten werden, daß die Markierung verloren geht.

RNA Polymerase aus, Masse [µg]/ Vol. [µl]	Salz- und Pufferzusam- mensetzung [mM, bzw. %]	Deriva-	
		Konz. [mM]	Temp. [°C]
Weizenkeim Pol II 2/10	10 HEPES-NaOH pH 7,9/ 60 KCl 0,8 MnCl ₂ / 0,25 DTT/ 5 Gly	0,5	37
Weizenkeim (Extrakt) 5-60/15-20	10 HEPES-NaOH pH 7,9/ 60 KCl od. 50 (NH ₄) ₂ SO ₄ / 0,8 MnCl ₂ / 0,25 DTT/ 5 Gly ²	0,5	30
Tabak (Extrakt) 17/10	10 HEPES-NaOH pH 7,9/ 75 (NH ₄) ₂ SO ₄ / 1,2 MnCl ₂ / 0,25 DTT/ 20 Gly	0,5	30
Hefe Pol I 2/10	50 HEPES-NaOH pH 7,9/ 5 MgCl ₂ / 1 DTT	0,5	30
Hefe Pol II 2/10	10 HEPES-NaOH pH 7,9/ 75 KCl 2,5 MnCl ₂ / 1 DTT	0,5	30
Hefe Pol III 1,5/10	50 HEPES-NaOH pH 7,9/ 5 MgCl ₂ / 1,25 MnCl ₂ / 1 DTT	0,5	30
<i>Anabaena</i> 2/10	20 HEPES-NaOH pH 8,0/ 10 MgCl ₂ / 100 KCl/ 0,5 DTT/ 0,1 EDTA	0,3	37
N4 Virion Pol 0,66/20	20 HEPES-NaOH pH 7,9/ 10 MgCl ₂ / 20 NaCl/ 1 DTT	0,4	37
N4 Aktivität II 5/20	80 HEPES-NaOH pH 7,9/ 10 MgCl ₂ / 0,2 DTT/ 0,1 EDTA	0,4	37
T7 Pol 0,5/15-20	40 HEPES-NaOH pH 7,9/ 10 MgCl ₂ / 50 NaCl	0,3- 0,4	37
T3 Pol 0,5/20	40 HEPES-NaOH pH 7,9/ 10 MgCl ₂ / 50 NaCl	0,4	37

Tab. 2 Reaktionsbedingungen zur Affinitätsmarkierung von RNA Polymerasen (Analytische Ansätze)

Die Salz- und Pufferzusammensetzungen beruhen auf den für die jeweiligen Enzyme verwendeten Konzentrationen bei Standardtranskriptions- oder Aktivitätstests (s. auch Text). Die angegebenen Mengen wurden als 10x konzentrierte Lösungen (Transkriptionspuffer) zu den Ansätzen gegeben. Die in den Polymerase-Präparationen selbst vorhandenen Salze (z.B. (NH₄)₂SO₄, Tris) sind, mit Ausnahme der Extrakte, nicht berücksichtigt.

te Zeit [min]	NaBH ₄ -Reduktion			[α - ³² P]NTP			Matrize
	Konz. [mM]	Temp. [°C]	Zeit [min]	Konz. [mM]	Temp. [°C]	Zeit [min]	
15- 20	2	20	20- 30	0,4- 1,0	37	10- 15	Plasmide ³ , Copolymere
5	2	0	10	0,1- 0,15	30	5	Plasmid ⁴
4	1	0	10	1,1	30	4	denat. DNA
30	10	30	30	1,3	30	30	denat. DNA
30	10	30	30	1,3	30	30	denat. DNA
30	10	30	30	0,1	30	20	poly[d(A-T)]
15	1	37	30	0,16	37	15	Plasmid ⁵
20	1	20	30	0,065	37	15	denat. u. ss N4 DNA
15	0,5	20	30	0,05	37	15	denat. N4 DNA
15	0,5	0	30	0,5	37	15	T7 DNA, Plasmide ⁶
15	0,5	0	30	0,33	37	15	T3 DNA

Die für Weizenkeim und T7 RNA Polymerase genannten Daten stellen systematisch optimierte Bedingungen in Bezug auf alle drei Reaktionsschritte dar. Ansonsten wurden die Parameter nur solange verändert, bis eine eindeutige Affinitätsmarkierung möglich war.

Die genannten Volumina geben das Volumen nach der NaBH₄-Reduktion an, d.h. im Fall von 10 µl erfolgte die Modifizierung in 9 µl, anschließend wurde 1 µl NaBH₄-Lösung und schließlich 1 µl [α -³²P]NTP zugegeben.

¹ Bei Gly (= Glycerin) bedeutet die angegebene Zahl % (v/v).

² Im Fall des Polymin P-Eluats, das selbst 200 mM (NH₄)₂SO₄ enthält, wurde ein 10x Transkriptionspuffer ohne KCl verwendet.

³ ple, cg2RR329

⁴ cg2RR329

⁵ pTE55

⁶ pAR436, pAR219

11.3. Abspaltung der 5'-gebundenen Oligonukleotide

Zur Abspaltung der bei der Affinitätsmarkierung über das 5'-Ende an ein Polypeptid gebundenen Oligonukleotide wurde ein Verfahren entwickelt, das auf dem von D'Alessio (1982) beschriebenen Vorgehen zum Entfernen des 5'-Caps von mRNA beruht (vgl. Fig. 5). Im ersten Schritt wird der Polypeptidanteil durch Verdauung mit Proteinase K in Gegenwart eines flüchtigen Puffers verkleinert und die Protease anschließend durch Phenylmethylsulfonylfluorid inaktiviert:

	2,5 - 5 µg	Aceton gefälltes Polypeptid
+	25 - 30 µl	10 mM NH_4HCO_3 pH 7,5-8
+	1 µl	0,2 mg/ml Proteinase K

	37°C / 3 h
+	1 µl 0,5 mg/ml Phenylmethylsulfonylfluorid in DMSO

Raumtemperatur / 20 min, 70°C / 10 min

Die Lösung wird im *speed vac concentrator* zur Entfernung von NH_4HCO_3 lyophilisiert. Anschließend erfolgt zur Spaltung der Phosphoanhydridbindung(en) am 5'-Ende des Derivats eine Verdauung mit saurer Pyrophosphatase aus Tabak. Dadurch sollte das Oligonukleotid vom Benzaldehyd- und dem verbliebenen Peptidanteil abgespalten werden.

+	4 µl	0,5 M NaCH_3COO pH 5,0, 1 mM EDTA, 50 mM 2-Mercaptoethanol
+	36 µl	H_2O (pH-Kontrolle: ≤ 6)
+	2 - 3 µl	4 U/µl saure Pyrophosphatase aus Tabak

37°C / 2,5 - 3,5 h

In einem letzten Schritt werden die Produkte dephosphoryliert, um eine bessere und eindeutigere Nachweismöglichkeit zu schaffen;

ansonsten hätte man u.U. die Schwierigkeit, zwischen zweifach (unvollständig durch Pyrophosphatase verdaut) und einfach 5'-phosphorylierten Oligonukleotiden zu unterscheiden, während durch die Phosphataseverdauung nur einheitlich dephosphorylierte oder völlig unverdaute Produkte vorliegen.

+ 1,5 - 2 µl	1 M Tris (pH-Kontrolle: 7-8)
+ 1 µl	2 U/µl alkalische Phosphatase (Präp. für Molekularbiologie)

Raumtemperatur / 2 h

12. PROTEOLYSE

12.1. Verdauungen mit Proteinase K und Pronase

20 mg/ml Pronase oder 10 mg/ml Proteinase K Stammlösungen wurden nach Maniatis *et al.* (1982) bei -20°C aufbewahrt, die Pronaselösung wie angegeben nach einer 2stündigen Selbstverdauung bei 37°C. Verdauungen mit beiden Enzymen erfolgten bei 30 oder 37°C bei pH 7-8 mit den jeweils angegebenen Mengen.

12.2. Verdauung mit Trypsin

TPCK-behandeltes Trypsin wurde in 0,1 M NH_4HCO_3 (pH 7,8-8) mit einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst und zur Verdauung mit 0,1 M NH_4HCO_3 so verdünnt, daß 1 µl die zur Verdauung jeweils angegebene Trypsin-Menge enthielt. Die mit Aceton gefällte Proteinprobe war in 10 mM NH_4HCO_3 aufgenommen worden. Die Verdauung erfolgte bei 30 oder 37°C und wurde nach den angegebenen Zeiten beendet.

12.3. Verdauung mit Chymotrypsin

Chymotrypsin wurde in einer Konzentration von 4 mg/ml in 1 mM HCl gelöst und zur Verdauung 1:100 mit H₂O verdünnt. Die vollständige Verdauung erfolgt nach Herstellerangaben bei pH 8,0 und 20 mM CaCl₂ mit 0,8 µg/ml Enzym bei 30°C, eine partielle Verdauung im System von Cleveland *et al.* (1977) wie in Fig. 11 Cc angegeben.

13. PUFFER

Die jeweils explizit angegebenen Puffer wurden i.a. als 10x Konzentrate hergestellt und aufbewahrt.

Zu Enzymreaktionen verwendete Puffer mit leicht flüchtigen Komponenten (NH₄⁺, HCO₃⁻, (C₂H₅)₃H⁺) oder 10x Transkriptionspuffer wurden steril filtriert oder, wenn möglich, aus autoklavierten Lösungen hergestellt.

Insbesondere wurden hergestellt:

Tris-HCl

Die Stammlösungen bei verschiedenen pH waren 1 oder 3 M konzentriert. Das angegebene pH wurde jeweils bei 25°C eingestellt.

1 M TRAB pH 8

70 ml (0,5 Mol) Triethylamin wurden in einem Erlenmeyerkolben in etwa 400 ml H₂O gelöst und solange unter Rühren mit festem CO₂ versetzt bis das pH auf 8 eingestellt war und auf 500 ml mit H₂O aufgefüllt. Die Lösung wurde durch ein Papierfilter filtriert und 2-4 Wochen bei 4°C aufbewahrt. Nach einer Woche sollte man allerdings das pH kontrollieren und gegebenenfalls erneut CO₂ zugeben.

ERGEBNISSE

1. ABORTIVE INITIATION

Die für die *E. coli* RNA Polymerase von Johnston und McClure (1976) gefundene abortive Initiationsreaktion erwies sich als völlig abhängig vom Initiationsfaktor σ . Dadurch konnte man nicht nur zwischen *core*-Enzym, das die abortive Initiation nicht katalysiert und *holo*-Enzym unterscheiden, sondern sogar ein Testsystem zur Quantifizierung von σ aufstellen (Hansen & McClure, 1979).

Einem Vorschlag von McClure *et al.* (1978) zufolge könnte sich deshalb eine abortive Initiation in anderen Systemen als Test zur Entdeckung von Initiationsfaktoren eignen.

Überraschenderweise konnte aber mit hochgereinigter RNA Polymerase II aus Weizenkeimen, deren katalytische Eigenschaften ansonsten der *E. coli core* RNA Polymerase ähnlich sind (Wickner *et al.*, 1972; Nath & Hurwitz, 1974; Lewis & Burgess, 1980), und die *in vitro* nicht zur spezifischen Initiation an natürlichen Promotoren fähig ist, eine zeitabhängige, katalytische abortive Initiation ohne zusätzliche Proteinfaktoren gefunden werden¹. Es wurde sogar zum ersten Mal für eine eukaryotische RNA Polymerase II eine *primer*-unabhängige Reaktion durch die Bildung von pppApU aus den beiden Nukleosidtriphosphaten ATP und UTP nachgewiesen (Mosig *et al.*, 1985).

¹ Frühere und kurz nach Mosig *et al.* (1985) veröffentlichte Arbeiten mit Weizenkeim RNA Polymerase II fanden entweder keine enzym- und zeitabhängige Dinukleotidsynthese (Yarbrough, 1982) oder behaupteten zwar eine katalytische Bildung, während die gezeigten Daten höchstens eine stöchiometrische Umsetzung belegen (Dietrich *et al.*, 1985). Mit anderen eukaryotischen Polymerasen II war bis dahin nur die *primer*-abhängige abortive Initiation bzw. Elongation durch das Enzym aus Kalbsthymus (Vaisius & Wieland, 1982) und durch Hefe RNA Polymerase II (Lescure *et al.*, 1981) gefunden worden.

Helmut Mosig hat die abortive Initiation der Weizenkeim RNA Polymerase II und ihre mögliche Bedeutung eingehend untersucht und charakterisiert (Mosig, 1988).

Da diese Reaktion zeigt, daß die Knüpfung einer Phosphodiesterbindung durch die gereinigte eukaryotische Weizenkeim RNA Polymerase II auch in einem artifiziellen System mit nur zwei Substraten erfolgt, kann man sie als eine Grundlage für die im nachfolgenden Kapitel beschriebenen Affinitätsmarkierung ansehen (Kap. 2). Dort wird an einem kovalent an das Enzym gebundenen Nukleotidderivat durch die Reaktion mit einem [α - 32 P]NTP eine Phosphodiesterbindung geknüpft. Dabei kann es aber nicht zur Freisetzung und Amplifizierung des gebildeten Dinukleotids kommen; somit handelt es sich nicht um eine abortive, sondern um eine fixierte, statische Dinukleotidsynthese.

Die folgenden Experimente vergleichen die *primer*-unabhängige und die *primer*-abhängige Reaktion der Weizenkeim RNA Polymerase II unter gleichen und ungleichen Konzentrationen der beiden Substrate und zeigen auch erstmals die *primer*-unabhängige Initiation der Hefe RNA Polymerase II.

1.1. ABORTIVE INITIATION DER WEIZENKEIM RNA POLYMERASE II

1.1.1. Abortive Initiation mit AMP oder ATP und [α - 32 P]NTP

Die bisherigen Untersuchungen der abortiven Initiation der Weizenkeim RNA Polymerase II mit verschiedenen Substratkombinationen (Schäffner, 1984; Mosig, 1988) arbeiteten mit äquimolaren Konzentrationen der jeweils eingesetzten Substrate, um keines der beiden zu bevorzugen und mehrere Ansätze in Bezug auf die Nukleotidkonzentration vergleichbar zu gestalten. Es ist aber durchaus denkbar, daß die Veränderung der Nukleotidkonzentrationen einen Einfluß auf die Natur und die Menge der synthetisierten Produkte ausübt.

Als Extrembeispiele wurden hier eine *primer*-unabhängige bzw. *primer*-abhängige abortive Initiation mit ATP bzw. AMP/ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$ unter äquimolaren Bedingungen mit je 200 μM oder unter ungleichen Verhältnissen mit 500 μM / 3 μM verglichen. Die Nukleotidkombinationen und der extreme Unterschied 500 : 3 im Fall verschiedener Konzentrationen wurden deshalb so gewählt, da bei der in Kap. 2.1. beschriebenen Affinitätsmarkierung der Weizenkeim RNA Polymerase ein Adenosin-Derivat in einer Konzentration von 500 μM als Startnukleotid und ein $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$ (0,1 bis 1 μM) als zweites Nukleotid verwendet werden. Dadurch ist ein Vergleich der beiden Reaktionen möglich.

Je ein Aliquot dieser Ansätze wurde direkt und nach einer anschließenden Verdauung mit alkalischer Phosphatase über ein 25% Sequenzgel analysiert (Fig. 2 und 3), die dephosphorylierten Produkte wurden zusätzlich im System PEI-Cellulose / 0,16 M LiCl chromatographiert (Fig. 4) und autoradiographiert.

Die Ansätze 500 μM AMP/3 μM $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$ ergeben jeweils Produkte im Bereich von Dinukleosiddiphosphaten bzw. -monophosphaten nach Phosphatase-Verdauung. Die annähernd gleichen Intensitäten der Signale belegen eine etwa gleich effiziente Synthese von pA^*pA , pA^*pC , pA^*pG und pA^*pU unter diesen Bedingungen (Fig. 2, 3, 4 und Kap. 1.1.2. Tab. 3 a-d).

Die entsprechende Versuchsreihe unter äquimolaren Substratbedingungen (200 μM AMP/200 μM $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$) zeigt die gleichen Signale, aber geringerer Intensität (Fig. 2, 3, 4 i-m). Dies bedeutet keineswegs eine Verringerung der Syntheserate, da dabei berücksichtigt werden muß, daß die spezifische Radioaktivität in diesem Fall nur 1/67 des Wertes der Versuche mit 3 μM $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$ betrug. Darüberhinaus erfolgt in den Ansätzen mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{Purin-Nukleosid-triphosphaten}$ eine starke pppApG- bzw. pppGpG-Synthese (Fig. 2, 3, 4 und Kap. 1.1.2. Tab. 3 i,l).

Die *primer*-unabhängigen Reaktionen ergeben mit 500 μM ATP/3 μM $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$ jeweils ähnlich starke pppApN-Signale . Äußerst überraschend ist die gleich hohe Intensität der pppApA-Bande , da in

Fig. 2 Gelelektrophoretische Analyse der abortiven Initiation mit Adenosinphosphaten und [α - 32 P]NTP ohne Behandlung mit alkalischer Phosphatase

Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 15 μ l mit 2,3 μ g Weizenkeim RNA Polymerase II, 0,6 μ g Plasmid p1e oder 1 μ g poly[d(A-T)] und mit den angegebenen Substratkonzentrationen 160 min bei 37°C inkubiert (s. Methoden und Material). Es wurde in allen Ansätzen 2,25 μ Ci [α - 32 P]NTP eingesetzt, so daß die spezifische Radioaktivität bei einer Konzentration von 3 μ M [α - 32 P]NTP 50 Ci/mMol $\pm$ 7% und bei 200 μ M 0,75 Ci/mMol betrug. Lediglich die Ansätze mit [α - 32 P]UTP enthielten im Vergleich zu den übrigen nur zwei Drittel der Radioaktivität; die Signale der UTP-Reaktion müssen also um etwa 50% höher veranschlagt werden. Dies hat aber keinen wesentlichen Einfluß auf die Interpretation der Experimente. Je ein Aliquot wurde über ein 25% Sequenzgel elektrophoretisch getrennt (s. Methoden). Das mit den Proben aufgetragene Bromphenolblau war dabei etwa 20 cm weit gewandert. Die Zuordnung der Produkte ist in Kap. 1.1.2. Tabelle 3 beschrieben. Alle schneller als pppApC wandernden radioaktiven Verbindungen sind in den kommerziellen [α - 32 P]NTP-Präparationen selbst vorhanden.

Ansätze mit Plasmid p1e als Matrize:

a,b,c,d	500 μ M AMP	+	3 μ M [α - 32 P]ATP,	-CTP,	-GTP,	-UTP
e,f,g,h	500 μ M ATP	+	3 μ M [α - 32 P]ATP,	-CTP,	-GTP,	-UTP
i,k,l,m	200 μ M AMP	+	200 μ M [α - 32 P]ATP,	-CTP,	-GTP,	-UTP
n,o,p,q	200 μ M ATP	+	[α - 32 P]ATP, + 200 μ M [α - 32 P]CTP,	-GTP,	-UTP	

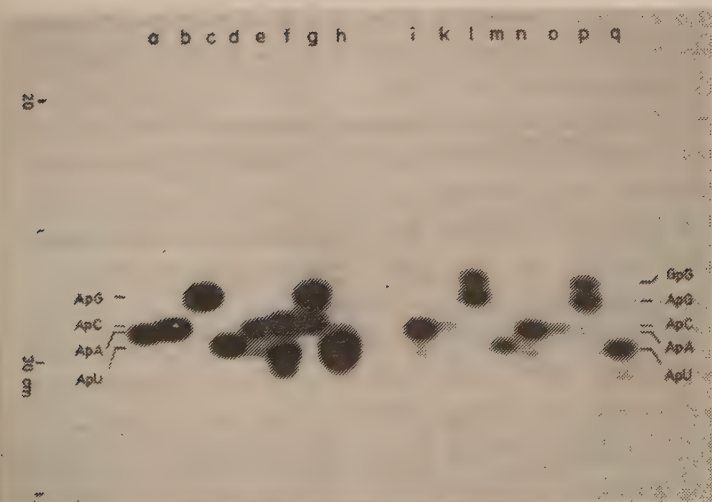
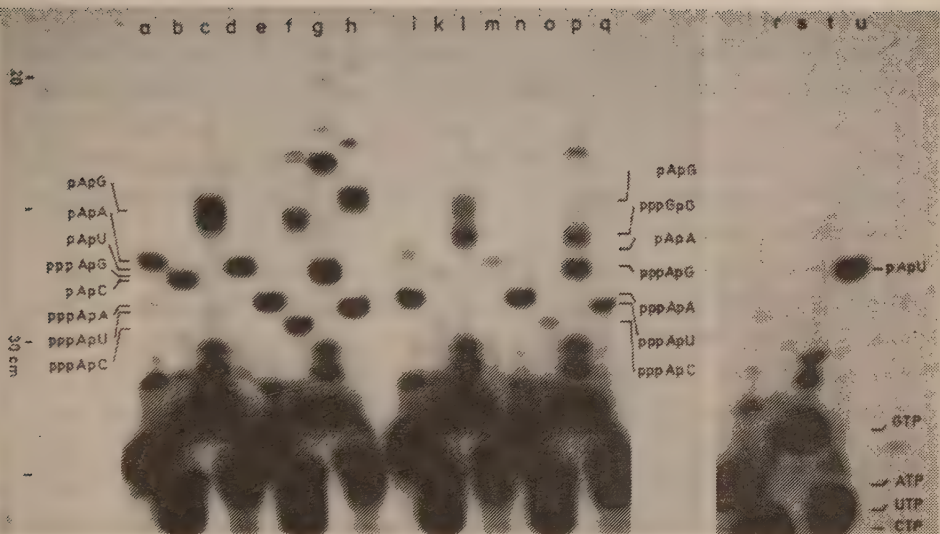
Ansätze mit poly[d(A-T)] als Matrize:

r,s,t,u	200 μ M AMP	+	200 μ M [α - 32 P]ATP,	-CTP,	-GTP,	-UTP
---------	-----------------	---	---	-------	-------	------

Fig. 3 Gelelektrophoretische Analyse der abortiven Initiation mit Adenosinphosphaten und [α - 32 P]NTP nach Verdauung mit alkalischer Phosphatase

Je ein Aliquot der in Fig. 2 a-q beschriebenen Ansätze zur abortiven Initiation wurde anschließend 1h mit 0,5 U alkalischer Phosphatase (Kälberdarm) verdaut und ein Aliquot davon in einem 25% Sequenzgel analysiert. Bromphenolblau wanderte 32 cm. Die Nomenklatur stimmt mit Fig. 2 überein. Die Zuordnung der Produkte ist in Kap. 1.1.2. Tab. 3 beschrieben.

a,b,c,d	500 μ M AMP	+	3 μ M [α - 32 P]ATP,	-CTP,	-GTP,	-UTP
e,f,g,h	500 μ M ATP	+	3 μ M [α - 32 P]ATP,	-CTP,	-GTP,	-UTP
i,k,l,m	200 μ M AMP	+	200 μ M [α - 32 P]ATP,	-CTP,	-GTP,	-UTP
n,o,p,q	200 μ M ATP	+	[α - 32 P]ATP, + 200 μ M [α - 32 P]CTP,	-GTP,	-UTP	



diesem Ansatz, der ausschließlich $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ in der hohen Konzentration von $500\text{ }\mu\text{M}$ enthielt, die Radioaktivität mehr als 100fach verdünnt war und er damit nicht direkt mit den übrigen vergleichbar ist. Das Signal reflektiert demnach eine um zwei Größenordnungen höhere Syntheserate (Fig. 2, 3, 4 und Kap. 1.1.2. Tab. 3 e-h). In den Ansätzen, die tatsächlich unter ungleichen Substratbedingungen durchgeführt wurden ($3\text{ }\mu\text{M}$ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$ N = C,G,U) findet man zusätzlich jeweils starke Signale im Bereich von Trinukleosidpentaphosphaten bzw. -diphosphaten nach Phosphatase-Verdauung, nämlich pppApApU bzw. ApApU und vermutlich pppAp(A,C)^2 bzw. Ap(A,C) und ppp(A,A,G)^2 bzw. (A,A,G) . Die entsprechende Bande eines möglichen pppApApA bzw. ApApA ist - wahrscheinlich auch wegen der geringen spezifischen Radioaktivität - nur schwach zu erkennen (Fig. 2, 3 und Kap. 1.1.2. Tab. 3 e-h; Fig. 4 f,h).

Unter äquimolaren Substratbedingungen $200\text{ }\mu\text{M}$ $\text{ATP}/200\text{ }\mu\text{M}$ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$ treten alle vier pppApN^3 auf, allerdings mit unterschiedlichen Syntheseraten. Während die Signale von pppApA , ppp(A,G)^2 und pppApU trotz der vergleichbar geringen spezifischen Radioaktivität stark sind und damit eine hohe Syntheserate widerspiegeln, ist das pppApC -Signal nur schwach ausgeprägt (Fig. 2, 3, 4 und Tab. 3 n-q). Im Ansatz mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ findet man noch eine weitere Bande, vermutlich pppGpG (Fig. 2 und Tab. 3 p).

Diese Differenzierung zwischen verschiedenen Sequenzen der Produkte unter diesen (Standard-)Bedingungen wird auch an anderen Matrizen mit unterschiedlichen Bevorzugungen bestimmter Produkte gefunden; i.a. ist die pppApA - und die pppApU -Synthese stark ausgeprägt. Andererseits gibt es Matrizen, z.B. T7D111 DNA, an denen keine pppApU -Bildung erfolgt (Mosig, 1988).

Das wirft die Frage auf, wodurch derartige Spezifitäten zustandekommen (s. Anhang; Mosig, 1988) und darüberhinaus grundlegender, ob die zwar eindeutig Matrizen-abhängige (Mosig *et al.*, 1985),

²Falls die Nukleotide in Klammern angegeben und durch Komma getrennt sind, ist ihre Sequenz nicht festgelegt.

³Im Fall von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ handelt es sich u.U. auch teilweise um pppGpA .

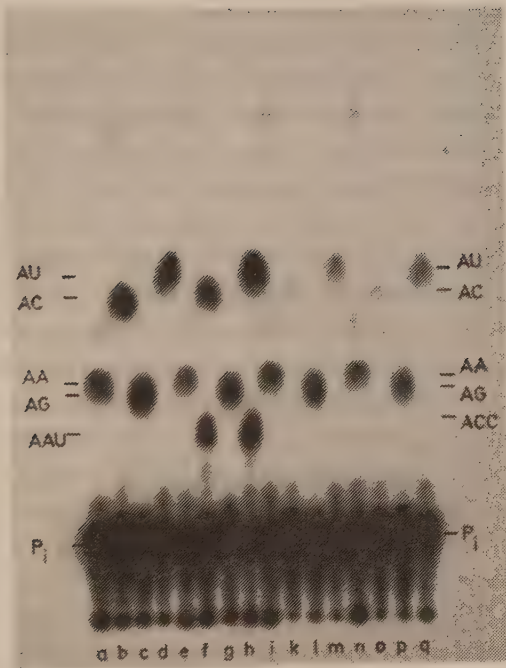


Fig. 4 Chromatographische Analyse der abortiven Initiation mit Adenosinphosphaten und $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$ nach Verdauung mit alkalischer Phosphatase

Je ein weiteres Aliquot der in Fig. 3 beschriebenen Phosphatase-Verdauungen der Ansätze zur abortiven Initiation wurde durch eine Chromatographie im System PEI-Cellulose / 0,16 M LiCl analysiert. Die Positionen der UV-Absorption von zugesetzten unmarkierten Dinukleosidmonophosphaten sind am Rand angegeben; die Positionen von ApG, ApApU und ApCpC wurden aufgrund der bekannten R_f -Werte dieser Verbindungen gekennzeichnet (Randerath & Randerath, 1967; s. Methoden).

a,b,c,d	500 μM AMP + 3 μM $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, -CTP, -GTP, -UTP
e,f,g,h	500 μM ATP + 3 μM $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, -CTP, -GTP, -UTP
i,k,l,m	200 μM AMP + 200 μM $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, -CTP, -GTP, -UTP
n,o,p,q	200 μM ATP + $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, + 200 μM $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$, -GTP, -UTP

abortive Synthese von Dinukleotiden überhaupt komplementär zu Sequenzen auf der DNA abläuft.

An einer Matrize, die nur kodierende T-A-, bzw. A-T-Zweiersequenzen enthält (poly[d(A-T)]) wird mit 5'-AMP als Startnukleotid und alternativ allen vier [α - 32 P]NTP ausschließlich pApU gebildet (Fig. 2 r-u). Dieses Experiment belegt offensichtlich die Komplementarität des synthetisierten Dinukleotids mit der DNA-Sequenz.

Die Versuche mit 500 μ M AMP oder ATP/3 μ M [α - 32 P]NTP wurden wegen einer Vergleichbarkeit zu den Konzentrationsverhältnissen bei der Affinitätsmarkierung in dieser Weise durchgeführt, stellen aber nach den gefundenen Ergebnissen nicht optimale, abortive Synthesebedingungen dar. Interessant ist, daß die Erhöhung der Konzentration des radioaktiven Substrats je nach Nukleotidkombination unterschiedliche Steigerungen der Syntheseraten bewirkt. Teilweise kommt es auch noch zu Überlagerungen mit anderen möglichen Produkten.

Der wesentliche Unterschied zur Affinitätsmarkierung ist die Amplifizierung von Ereignissen bei der abortiven Initiation durch eine mehrfach wiederholte Synthese, während die Affinitätsmarkierung nur von möglichen Einzelereignissen abhängt. Wichtig im Hinblick darauf ist deshalb, daß durch diese Experimente gezeigt wurde, daß bei der abortiven Initiation die Katalyse aller A~pN-Bindungen nachweisbar und abhängig von komplementären Sequenzen auf der DNA ist.

Dies muß als Hauptergebnis in Bezug auf die Affinitätsmarkierung festgehalten werden. Dort sollte bei einem ähnlichen Verhalten das analoge Ergebnis erhalten werden, nämlich die Markierung mit allen Kombinationen eines Adenosin-Derivats und eines [α - 32 P]NTP, sofern eine entsprechende DNA-Matrize eingesetzt wird.

1.1.2. Produktcharakterisierung

In einem 25% Sequenzgel werden Oligonukleotide i.a. der Größe nach aufgetrennt (s. aber unten). Die Mobilität der Dinukleotide war durch direkte Sequenzierung geklärt worden (Mosig *et al.*, 1985; Mosig, 1988) und deutlich von den schneller wandernden Ausgangsprodukten verschieden. Die genaue Klassifizierung erfolgte nach Plausibilitätskriterien, durch zusätzliche Informationen über die Ladung der Produkte und die Mobilität und die radioaktive Markierung der Substrate, durch die Verifizierung bestimmter Sequenzen nach einer 5'-Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase über eine parallele Auftrennung in einem anderen Trennsystem und auch durch den Vergleich von Ansätzen mit unterschiedlicher Substratzusammensetzung (Tab. 3).

So war es zunächst plausibel anzunehmen, daß ein Ansatz mit AMP und [α - 32 P]UTP zur Synthese von pA*pU, dagegen mit [α - 32 P]GTP zu pA*pG führt. Die Mobilität vergleichbarer Dinukleosiddiphosphate (z.B. pApN) oder -tetraphosphate (z.B. pppApN) entspräche auch bei dieser Annahme den unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten der Nukleosidtriphosphate (CTP > UTP > ATP > GTP; Fig. 2).

Produkte gleicher Sequenz laufen bei einem höheren Phosphorylierungsgrad wegen der erhöhten negativen Ladung in der Elektrophorese schneller (pppNpX > pNpX » NpX; Mosig *et al.*, 1985).

So handelt es sich z.B. beim Hauptprodukt der Reaktion 500 μ M AMP/3 μ M [α - 32 P]ATP um pA*pA; darunter ist eine schwache Bande zu erkennen, die die gleiche Mobilität aufweist wie das Hauptprodukt in Ansätzen mit ATP als einzigem Substrat (Fig. 2 a,e,n) und dadurch auch als pppApA verifiziert sein sollte. Beide Banden treten auch mit umgekehrter Intensität im Ansatz 200 μ M AMP/200 μ M [α - 32 P]ATP auf (Fig. 2 i). Nach einer 5'-Dephosphorylierung verhält sich das Hauptprodukt in allen vier Fällen übereinstimmend mit diesen Zuordnungen gleichartig wie ApA (Fig. 3 und 4 a,e,i,n).

Adeninnukleotid / [α - 32 P]NTP		500 μ M / 3 μ M		200 μ M / 200 μ M	
AMP / A	a	pApA	pppApA	i	pApA pppApA
	b	pApC		k	pApC
	c	pApG		l	pApG pppGpG
	d	pApU		m	pApU
ATP / A	e	pppApA ^a	pppApApA ^a	n	pppApA ^b
	f	pppApC	pppAp(A, C)	o	pppApC
	g	pppApG	ppp(A, A, G)	p	pppApG pppGpG
	h	pppApU	pppApApU	q	pppApU

Tab. 3 Zusammenstellung und Klassifizierung der Produkte bei der abortiven Initiation am Plasmid ple

Die Ansätze (25 μ l) enthielten die angegebenen Substratkonzentrationen und -kombinationen, 2,3 μ g Weizenkeim RNA Polymerase II und 0,6 μ g ple und wurden 160 min bei 37°C inkubiert. Die Analysen erfolgten wie in Fig. 2, 3 und 4 beschrieben; die Bezeichnungen a - q stimmen mit der dortigen Nomenklatur überein. Die Angaben der Verbindungen in Normalschrift bedeuten, daß diese als solche identifiziert wurden, und in Kursivschrift wahrscheinlich die aufgeführte Struktur besitzen; falls die Sequenz nicht eindeutig ist, sind die Nukleotide in Klammern durch ein Komma getrennt angegeben. Fettdruck entspricht einem starken, Einfachdruck einem schwachen Signal in der Autoradiographie.

^a Ansatz mit 500 μ M [α - 32 P]ATP als einzigem Substrat

^b Ansatz mit 200 μ M [α - 32 P]ATP als einzigem Substrat

Die 5'-dephosphorylierten Produkte weisen einige Anomalien bei der Elektrophorese im Vergleich zu den 5'-Nukleosidphosphaten auf. ApC hat nicht, wie erwartet, die größte Mobilität unter den ApN, sondern die Abfolge ist $\text{ApU} > \text{ApA} > \underline{\text{ApC}} > \text{ApG}$ (Fig. 3 a-d; durch eine chromatographische Analyse (s.u., Fig. 4 a-d) wurde ApC auch tatsächlich bestätigt). Bei den Trinukleosiddiphosphaten NpXpY macht sich die höhere Ladungsdichte entscheidend bemerkbar, wodurch sie schneller als Dinukleosidmonophosphate NpX laufen; erst ab einem Octamer wird wieder eindeutig nach der Größe aufgetrennt (s. Methoden).

Das stärkste Argument bei der Identifizierung der Produkte liefert aber die parallele chromatographische Analyse der Phosphatase-verdauten Ansätze im System PEI-Cellulose / 0.16 M LiCl (Fig. 4). In Übereinstimmung mit den bisher abgeleiteten Strukturen konnten dort anhand ihrer R_F -Werte und durch die Komigration mit der UV-Absorption von zugesetzten unmarkierten Referenzverbindungen ApA, ApC, ApG, ApU und ApApU verifiziert werden.

In den Ansätzen 200 μM AMP oder ATP/200 μM [α - ^{32}P]GTP konnten die Produkte zumindest teilweise aufgrund der unterschiedlichen Substratzusammensetzung klassifiziert werden. In beiden Fällen sind zwei Hauptprodukte auszumachen, wovon je eine in beiden Ansätzen die gleiche Mobilität besitzt und bei AMP/[α - ^{32}P]GTP eine langsamer, wie pApG (Fig. 2 c vs. l) und bei ATP/[α - ^{32}P]GTP eine schneller wie pppApG (Fig. 2 g vs. p) läuft. Die Elektrophorese nach der Phosphatase-Verdauung zeigt dagegen je zwei Produkte gleicher Mobilität, wobei das schnellere wie ApG wandert (Fig. 3 c vs. l,p) und die Chromatographie ebenfalls ein ApG belegt (Fig. 4 l,p). Die weitere Bande in Fig. 3 l,p ist vermutlich GpG, da es sich aufgrund der Mobilität um ein Dinukleosidmonophosphat handeln sollte, das obendrein langsamer als ApG läuft. Ein wesentlich höheres Oligonukleotid (größer als mindestens 5mer, s.o.) kann man aufgrund der Banden in den unbehandelten Ansätzen (Fig. 2 l,p) ausschließen.

Diese Informationen lassen die Interpretation zu, daß im AMP/[α - 32 P]GTP Ansatz pA*pG und pp*pG*pG und bei ATP/[α - 32 P]GTP pp*pG*pG und pppA*pG gebildet wurde, die durch Phosphatase in die entsprechenden Produkte A*pG und G*pG überführt wurden. Ein mit pppA*pG wahrscheinlich komigrierendes pp*pGpA kann nicht ausgeschlossen werden; es wäre aber nach der Dephosphorylierung wegen der fehlenden Markierung als GpA nicht mehr nachweisbar.

Der Ansatz 500 μ M ATP/3 μ M [α - 32 P]CTP zeigt neben dem Dinukleosid-tetraphosphat pppA*pC eine Bande der Mobilität eines Trinukleosidpentaphosphats (Fig. 2 f). Da ein Pyrimidinstart - besonders bei den Konzentrationsverhältnissen 500 μ M ATP : 3 μ M CTP - unwahrscheinlich ist, handelt es sich bei dem Produkt möglicherweise um ein pppAp(A,C), und u.U. um ein Gemisch aus beiden Sequenzen, die als Trinukleosidpentaphosphate in der Gelelektrophorese nicht trennbar wären, aber als Trinukleosiddiphosphate die beobachtete Doppelbande unterhalb der ApC-Bande erzeugen könnten (Fig. 3 f).

1.2. ABORTIVE INITIATION DER HEFE RNA POLYMERASE II

Für die RNA Polymerase II aus *Saccharomyces cerevisiae* (Dezélée *et al.*, 1972; Sentenac, 1985) ist bisher nur die *primer*-abhängige abortive Initiation mit Dinukleosidmonophosphaten und Nukleosidmonophosphaten (Lescure *et al.*, 1981), nicht aber die *primer*-unabhängige Reaktion mit zwei Nukleosidtriphosphaten beschrieben worden.

Ein Experiment mit ATP und [α - 32 P]UTP führt sowohl an denaturierter Kalbsthymus DNA (ohne Beleg) wie an Plasmid DNA (ple) zur Synthese eines pppApU wie die Papierchromatographie zeigt (Fig. 5A). Dieser Befund wird durch die Auftrennung in einem 25% Sequenzgel bestätigt (ohne Beleg). Darüberhinaus wandert nach einer Verdauung

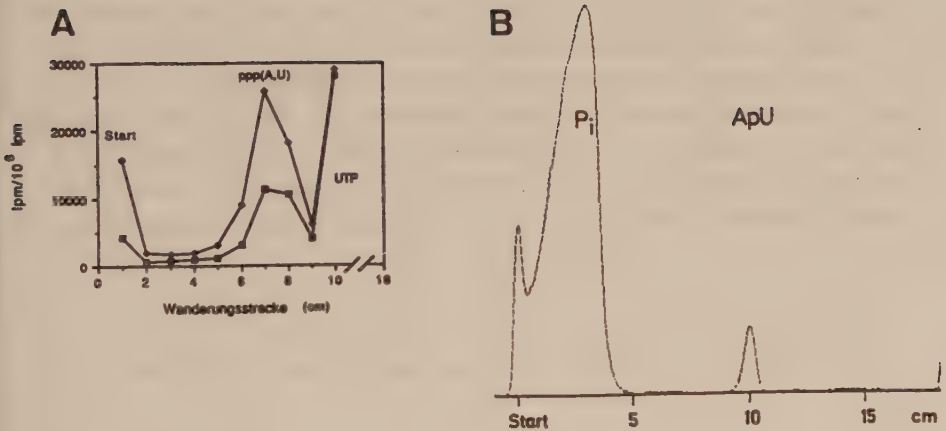


Fig. 5 pppApU-Synthese durch RNA Polymerase II aus *S. cerevisiae*

2 µg Hefe RNA Polymerase II wurden in einem 20 µl Ansatz in Gegenwart von 0,75 µg Plasmid DNA (ple) mit 200 µM ATP und 200 µM [α -³²P]UTP (1 Ci/mMol) 2 h bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde ohne den Zusatz (♦) oder mit 1,5 µg/ml α -Amanitin (⊗) durchgeführt.

- A** Papierchromatographische Analyse im System Whatman 3MM /Fließmittel III (s. Methoden). Die Radioaktivität von 1cm-Streifen wurde im Szintillationszähler bestimmt und diese Werte jeweils auf eine Gesamtradioaktivität von 10⁶ Ipm normiert.
- B** Chromatographische Analyse nach Verdauung eines Aliquots mit alkalischer Phosphatase im System PEI-Cellulose / 0,16 M LiCl. Die Autoradiographie wurde densitometrisch ausgewertet (s. Methoden). Die Pfeile geben die Position von freiem Phosphat bzw. die UV-Absorption von zugesetztem unmarkiertem ApU an.

des Ansatzes mit alkalischer Phosphatase ein Teil der Radioaktivität mit Referenz ApU (Fig. 5B). Die Synthese von pppApU wird durch 1,5 µg/ml α -Amanitin zu etwa 50% gehemmt; das steht im Einklang mit der für die RNA Synthese bekannten Hemmung des Enzyms durch dieses Toxin (Sentenac, 1985).

Da neben der Weizenkeim RNA Polymerase II (s. Kap. 1.1.; Mosig *et al.*, 1985) auch das entsprechende Enzym aus Kalbsthymus (Hinrichsen *et al.*, 1985) eine derartige *primer*-unabhängige Reaktion katalysiert, scheint es sich um eine allgemeine Fähigkeit eukaryotischer RNA Polymerasen II zu handeln, die aber im Gegensatz zur *E. coli* RNA Polymerase keine Korrelation zu bekannten *in vivo* Promotoren aufweist (Johnston & McClure, 1976; Mosig, 1988; s. Anhang).

2. AFFINITÄTSMARKIERUNG

Im folgenden wird die von Grachev *et al.* (1987a) beschriebene Methode zur Affinitätsmarkierung der *E. coli* RNA Polymerase auf andere virale, pro- und vor allem eukaryotische Systeme ausgeweitet, charakterisiert und ihre Interpretation als funktionelle Affinitätsmarkierung unter verschiedenen Aspekten überprüft.

2.1. WEIZENKEIM RNA POLYMERASE II

2.1.1. Spezifische Markierung der 140k-Untereinheit (W140)

RNA Polymerase II aus Weizenkeimen wurde in Abwesenheit von DNA mit dem Substratanalogon pHB-ATP (p-Hydroxybenzaldehydester von ATP) umgesetzt (s. Material und Methoden); eine anschließende Reduktion mit NaBH₄ wandelt das dabei gebildete Imin in eine irreversible C-N-Einfachbindung um. Die Inkubation derart modifizierter RNA Polymerase-Moleküle mit [α -³²P]UTP als zweitem Substrat in Gegenwart einer DNA-Matrize führt nach der Auftrennung des gesamten Ansatzes in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel zu einer intensiven radioaktiven Bande gleicher Mobilität wie die zweitgrößte Untereinheit mit der relativen Molmasse 140k (W140)¹. Sie ist resistent gegen RNase A-, gegen DNase I-, aber sensitiv gegenüber Proteinase K-Verdauung (Fig. 6 a-e).

¹In vielen Enzympräparationen erscheint sie als drittgrößte Untereinheit, da die größte durch Proteolyse während der Anreicherung teilweise gespalten sein kann (Mr 220k und 180k; Link *et al.*, 1978; Guilfoyle *et al.*, 1984).

Damit ist offensichtlich, daß die gefundene Radioaktivität an ein Polypeptid gebunden vorliegt, und zwar an W140². Diese Markierung von W140 unterbleibt völlig, wenn das Derivat nicht zur Inkubationsmischung gegeben wird, wenn es durch ATP ersetzt wird oder auch, wenn lediglich der Reduktionsschritt weggelassen wird. Das gleiche gilt, falls der Ansatz keine DNA enthält (Fig. 6 f-i). Der Zusatz von 1 µg/ml α -Amanitin (Fig. 6 k) ergibt eine mehr als 90%ige Abnahme der Markierung wie ein Vergleich der Intensität der Banden zeigt (s. Methoden).

Diese Befunde lassen zum einen den Schluß zu, daß die Reaktion mit dem Nukleotidderivat eine unbedingte Voraussetzung für die Markierung von W140 ist; dabei weist die Notwendigkeit der Reduktion darauf hin, daß tatsächlich eine Schiff-Base als Zwischenprodukt aufgetreten ist und durch diesen Schritt erst stabilisiert wurde. Zum anderen erfolgt die Markierung nur unter Bedingungen, die eine Enzymreaktion erlauben. Sie ist vollständig abhängig vom Zusatz einer DNA-Matrize und wird durch α -Amanitin im gleichen Ausmaß gehemmt wie die Gesamtaktivität oder die abortive Dinukleotidsynthese (Jendrisak & Burgess, 1975; Hodo & Blatti, 1977; Hahn & Servos, 1980; Mosig *et al.*, 1985). Eine weitere wichtige Beobachtung ergibt der Vergleich von Bahn b und l (Fig.5). Die Markierung von W140 nimmt um das Zweifache zu, wenn die DNA-Matrize erst im letzten Schritt zusammen mit [α -³²P]UTP und nicht bereits während der Umsetzung mit dem Nukleotidderivat vorhanden ist (s. 2.1.5.3)³.

Zusätzlich zu der beschriebenen spezifischen Markierung von W140 erscheinen noch schwächere Banden im Bereich von Polypeptiden

²Die Möglichkeit, daß es sich dabei nicht um W140, sondern um ein unbekanntes zufällig mit W140 komigrierendes Abbauprodukt der größten Polymeraseuntereinheit handeln könnte, kann dadurch ausgeschlossen werden, daß mit der größten Untereinheit in intakter Form keinerlei Radioaktivität assoziiert ist.

³In anderen Experimenten war dieser Faktor in Abhängigkeit vom verwendeten Derivat und dessen Konzentration verändert, zeigte aber stets die gleiche Tendenz (bis zu 9facher Verstärkung).

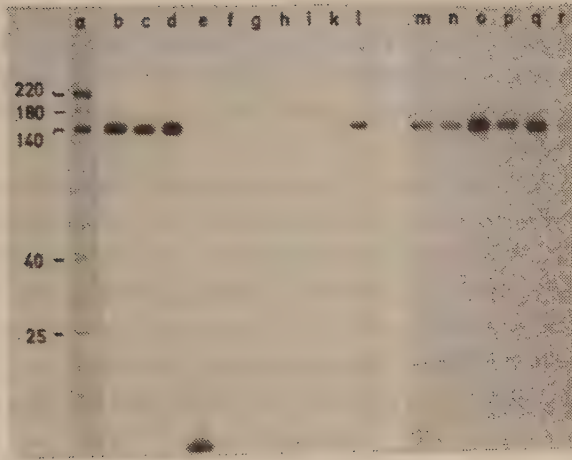


Fig. 6 Gelelektrophoretische Analyse der Affinitätsmarkierung von Weizenkeim RNA Polymerase II

Die Ansätze wurden auf zwei (a-l und m-r) 6 - 18% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Als Matrize wurden jeweils 0,8 µg cg2RR329 eingesetzt (s. Methoden und Material).

- a Proteinbanden, gefärbt mit Coomassie G250. Die Zahlen geben die relative Molmassen (10^{-3}) der Untereinheiten an.
b vollständiges Experiment mit 0,5 mM pHB-ATP
c Exp. b + 0,1 µg RNase A, 37°C, 15 min
d Exp. b + 0,05 µg DNase I, 37°C, 15 min
e Exp. b + 0,5 µg Proteinase K, 37°C, 15min
f wie b ohne Derivat
g wie b mit 0,5 mM ATP anstelle von pHB-ATP
h wie b ohne NaBH₄
i wie b ohne DNA
k wie b mit 1 µg/ml α-Amanitin
l wie b, aber Zugabe der DNA bereits im ersten Reaktionsschritt

m - r vollständige Experimente mit je 0,5 mM

- | | | | |
|---|---------|---|---------|
| m | GTmP | n | oHB-ATP |
| o | pHB-GTP | p | oHB-GTP |
| q | AB-ADP | r | AB-AMP |

mit einer Molmasse kleiner als 30k. Diese werden aber vollständig durch RNase A und nur teilweise durch Proteinase K abgebaut. Darüberhinaus sind diese Banden auch unabhängig vom Reduktionsschritt (Fig. 6 b,c,e,h). Trotz dieser Unspezifität in Bezug auf eine Affinitätsmarkierung scheint ein Zusammenhang mit der enzymatischen Aktivität der Polymerase gegeben zu sein, da diese Banden in einem Ansatz ohne DNA oder mit α -Amanitin nicht auftreten (Fig. 6 i,k).

Außer pHB-ATP kann eine ganze Palette anderer Nukleotidderivate zur Markierung von W140 verwendet werden (Fig. 6 m-r). Es wurden eingesetzt: die o-Hydroxybenzaldehydester von ATP und GTP (oHB-ATP und -GTP, Fig. 6 n,p), der p-Hydroxybenzaldehydester von GTP (pHB-GTP, Fig. 6 o), Derivate von ADP und AMP (AB-ADP und AB-AMP, Fig. 6 q und r), deren terminales Phosphat mit 4-[N-(2'-hydroxyethyl),N-methyl]aminobenzaldehyd verestert ist oder das phosphorylierende Trimetaphosphat von GTP (Fig. 6 m) (s. Methoden).

Eine gesamte Analyse der Abhängigkeit der Markierung von der enzymatischen Aktivität, wie sie oben für pHB-ATP beschrieben wurde, ist auch für AB-ATP (Grachev *et al.*, 1986a) und für AB-ADP (ohne Belege) mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt worden. Die Tatsache, daß sowohl in ihrer chemischen Reaktivität als auch sterisch verschiedene Derivate eine spezifische Markierung ergeben, muß implizieren, daß mehrere, auch chemisch unterschiedliche Bindungsstellen geeignet vorhanden sind und eine Flexibilität des Peptidgerüsts und auch besonders der reaktiven Seitenkette am Derivat eine Rolle spielen sollte.

2.1.2. Komplementarität der Markierung zu Zweiersequenzen der DNA

Die Markierung von W140 ist nicht abhängig von der Art und Quelle der eingesetzten DNA. Zirkuläre Plasmidvektoren mit und ohne Insert und linearisierte DNA-Fragmente sind aktiv (ohne Belege), d.h. sie sollten als Matrizen für die Bildung von Phosphodiesterbindungen (Kap. 2.1.3.) dienen. Dies steht mit den Beobachtungen bezüglich der verwendeten DNA bei der abortiven Dinukleotidsynthese im Einklang. In den Kapiteln 1.1. und 1.2. wurde gezeigt, daß an natürlicher DNA mit statistischer Sequenz die Synthese von pApA, pApC, pApG und pApU nachgewiesen werden kann, falls AMP und eines der vier $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$ als Substrate verwendet wurden. Setzt man dagegen synthetische Copolymere, wie z.B. poly[d(A-T)] ein, so erfolgt lediglich die Synthese des zur DNA-Sequenz komplementären Dinukleotids, z.B. pApU. Hier wurde nun untersucht, ob sich dieses Verhalten der abortiven Dinukleotidsynthese in der Markierung von W140 widerspiegelt.

Dazu wurde durch AB-ADP modifizierte Weizenkeim RNA Polymerase II in Gegenwart von Plasmid-DNA alternativ mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, -CTP, -GTP oder -UTP inkubiert. Die Autoradiographie nach einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigt in allen vier Fällen eine Markierung von W140 (Fig. 7 a-d). Wird das Experiment so durchgeführt, daß die DNA bereits während der Modifizierung vorhanden ist, so erhält man das gleiche Ergebnis; lediglich das Ausmaß der Markierung ist geringer (ohne Belege; Kap. 2.1.1.; 2.1.5.3.).

Die Banden ($\leq 30\text{k}$), die sich im Fall von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ als unspezifisch erwiesen hatten (s. Kap. 2.1.1.), treten auch mit anderen $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$ auf.

Setzt man anstelle der Plasmid-DNA poly[d(A-T)] ein, so ergibt der Test aller möglichen Kombinationen aus Adenosin- oder

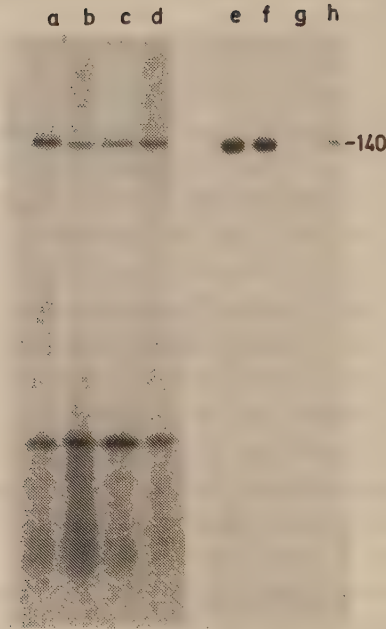


Fig. 7 Abhängigkeit der Affinitätsmarkierung von Sequenzen auf der DNA

Die Ansätze wurden über 5 - 18% (a-d), bzw. 6 - 18% (e-h) SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt (s. Methoden).

a - d 2 μ g Weizenkeim RNA Polymerase II wurden mit AB-ADP modifiziert, und dann in Gegenwart von 0,6 μ g Plasmid-DNA (ple) und alternativ [α - 32 P]ATP (a), -CTP (b), -GTP (c) oder -UTP (d) umgesetzt.

e - h 2 μ g Polymerase wurden mit pHB-ATP modifiziert und dann in Gegenwart von 2 μ g poly[d(A-T)] mit [α - 32 P]UTP (e), ATP + [α - 32 P]UTP (f), [α - 32 P]ATP (g) oder UTP + [α - 32 P]ATP (h) umgesetzt. Vor der Denaturierung wurden diese Ansätze mit 6 μ g/ml RNase A, 37°C, 15 min behandelt.

Guanosin-Derivat und den vier $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$ eine intensive Markierung nur im Fall Adenosin-Derivat (pHB-ATP) mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ (z.B. Fig. 7 e,g). Diese Untersuchungen, auch an anderen Matrizen, wurden auf meine Anregung hin von Stephan Glaser systematisch durchgeführt (Glaser, 1987).

Eine effiziente Markierung von W140 erfolgt also nur, ebenso wie die abortive Dinukleotidsynthese, wenn der eingesetzten Kombination Derivat, bzw. Startnukleotid / $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$ komplementäre Zweiersequenzen auf der verwendeten DNA-Matrize entsprechen.

Einen weiteren Schluß läßt die Beobachtung zu, daß ein Ansatz, der mit pHB-ATP modifizierte Polymerase, $\text{poly}[\text{d}(\text{A-T})]$ und $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ enthält dann eine Markierung ergibt, wenn auch nicht-radioaktives UTP zugesetzt wird (Fig. 7 g,h). Das radioaktive AMP könnte demnach als komplementäres drittes Nukleotid nach dem unmarkierten UMP eingebaut werden, d.h. daß auch die Synthese eines Trinukleotids mit einem kovalent an die Polymerase gebundenen Startnukleotid möglich wäre ($\text{W140} \sim \text{ApU}^*\text{pA}$). Der umgekehrte Fall, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ und nicht-radioaktives ATP ergibt die gleich intensive Markierung wie $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ allein, was mit obigem Schluß in Einklang steht ($\text{W140} \sim \text{A}^*\text{pUpA}$ und/oder $\text{W140} \sim \text{A}^*\text{pU}$).

2.1.3. Phosphodiesterbindungen an der markierten Polymerase-Untereinheit W140

Obwohl die bisher gezeigten Ergebnisse völlig im Einklang mit einer funktionellen, von der enzymatischen Aktivität abhängigen Markierung sind, ist es eine *conditio sine qua non* durch den Nachweis der erfolgten Katalyse von 5',3'-Phosphodiesterbindungen direkt zu zeigen, daß die an W140 gebundene Radioaktivität auf der Übertragung eines $^{32}\text{P}]\text{NMP}$ auf die 3'-Hydroxylgruppe des kovalent gebundenen Startnukleotids beruht. Dazu wurde versucht, die postulierten Di-, oder möglicherweise

Oligonukleotide enzymatisch vom Polypeptid zu trennen und als solche mittels verschiedener Trennverfahren und durch nachfolgende Ribonuklease-Spaltungen zu charakterisieren.

Das markierte W140 sollte bei Verwendung eines ADP- oder ATP-Derivates aufgrund der an beiden Seiten veresterten Phosphatkette am 5'-Ende des RNA-Anteils eine prinzipiell analoge Struktur wie das 5'-Cap einer m-RNA besitzen (XpppApN..); diese kann mit saurer Pyrophosphatase aus Tabak hydrolysiert und die RNA mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert werden (D'Alessio, 1982). Eine derartige Verdauung könnte deshalb zur Abspaltung der Phosphate und des Benzaldehyd- und Peptidteils am 5'-Ende des gebundenen Dinukleotids oder höherer Oligonukleotide führen (s. Schema, S. 6/7).

2.1.3.1. Nachweis von ApU

Weizenkeim RNA Polymerase II wurde mit AB-ADP und [α - 32 P]UTP an Plasmid-DNA als Matrize umgesetzt und vor der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit RNase A behandelt, um eventuell gebildete freie RNA zu verdauen (s. Methoden). Der Polypeptidanteil des eluierten markierten *W140 wurde durch Proteinase K verkürzt. Nach der Inaktivierung der Proteinase K mit PMSF wurde der Ansatz nun mit Pyrophosphatase und Phosphatase⁴ verdaut (s. Methoden).

Die chromatographische Analyse der Produkte in vier verschiedenen Systemen und die Elektrophorese in einem 25%igen Sequenzgel zeigt, daß ein Teil der Radioaktivität⁵ wie authentisches ApU wandert (Fig. 8 a und 9). In Proben, die entweder nur mit Pyro-

⁴In dieser Arbeit wurde im Unterschied zu D'Alessio, 1982, der bakterielle alkalische Phosphatase angibt das Enzym aus Kälberdarm verwendet.

⁵Die Integration des Gipfels im System PEI-Cellulose/0,16 M LiCl ergibt 40% der Radioaktivität (Fig. 9 a).

phosphatase oder nur mit alkalischer Phosphatase behandelt wurden treten dagegen höchstens Spuren von ApU auf (Fig. 9 e,f). Der mit ApU im System PEI-Cellulose / 0,16 M LiCl komigrierende Gipfel wurde mit 1 M TEAB pH 8,0 eluiert (s. Methoden) und verhielt sich sowohl bei der erneuten Chromatographie im selben System als auch mit 0,5 M NaHCOO pH 3,6 als Elutionsmittel wie Referenz-ApU. Nach einer Spaltung des Eluats mit Ribonuklease T2 läuft die Radioaktivität wie Referenz-Ap und nach einer Phosphodiesterase I Verdauung wie pU (Fig. 10 A).

Etwa 20% der Radioaktivität wandern wie freies Phosphat und weitere 20% (in manchen Versuchen auch mehr) bleiben auf PEI-Cellulose an der Auftragsstelle liegen. Dabei handelt es sich zumindest teilweise um nicht vollständig verdaute Produkte, da eine Elution dieser Radioaktivität und eine anschließende nochmalige Verdauung mit saurer Pyrophosphatase und alkalischer Phosphatase zu weiterem ApU führt (ohne Belege). Sowohl in den chromatographischen Analysen als auch im 25%igen Sequenzgel tritt Radioaktivität im Bereich von Trinukleosiddiphosphaten auf (Fig. 8 a und 9).

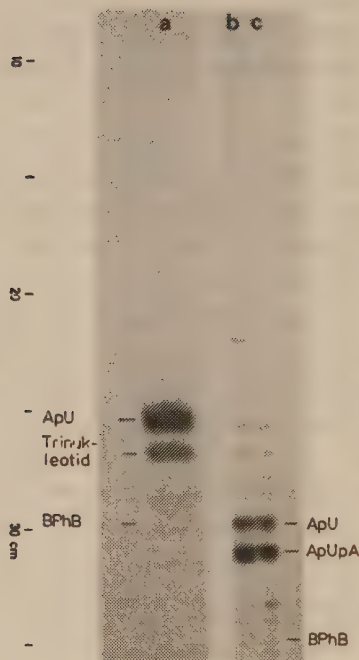


Fig. 8 Gelelektrophoretische Auftrennung nach Spaltung des markierten *W140 mit Pyrophosphatase und alkalischer Phosphatase

Die Elektrophorese erfolgte über ein 25%iges Sequenzgel. Das eluierte *W140 wurde mit Proteinase K, Pyrophosphatase und alkalischer Phosphatase verdaut (s. Methoden). Die Position von ApU und ApUpA ist nach radioaktiven Vergleichsproben angegeben; in a wurde kein Trinukleotid als Marker verwendet, die aber in der gekennzeichneten Region wandern (s. Methoden, bzw. Bahn c).

- a Die Markierung erfolgte mit 290 µg/ml RNA Polymerase, 0,5 mM AB-ADP, 0,2 µM [α - 32 P]UTP (3000 Ci/mMol) und als DNA-Matrize 70 µg/ml cg2RR329. Vor der Denaturierung und Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgel wurde der Ansatz mit 4 µg/ml RNase A, 37°C, 12 min behandelt. Das eluierte *W140 wurde anschließend mit Proteinase K, Pyrophosphatase und alkalischer Phosphatase verdaut (s. Methoden).
- b Die Markierung und Elution erfolgte ähnlich wie unter a beschrieben (220 µg/ml Polymerase, 0,5 mM pHB-ATP, 0,7 µM [α - 32 P]UTP (1200 Ci/mMol), 70 µg/ml cg2RR329). Die RNase A-Behandlung vor der Denaturierung unterblieb jedoch in diesem Fall.
- c wie b, aber nach alkalischer Phosphatase zusätzlich mit 50 µg/ml Pronase, 37°C, 30 min verdaut.

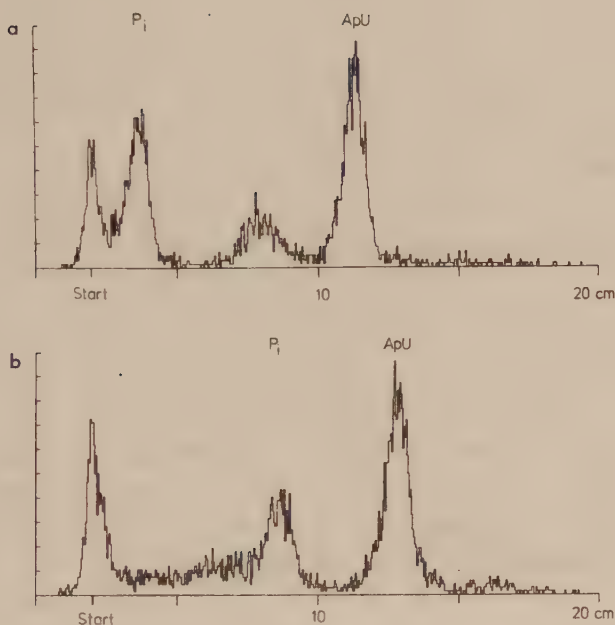
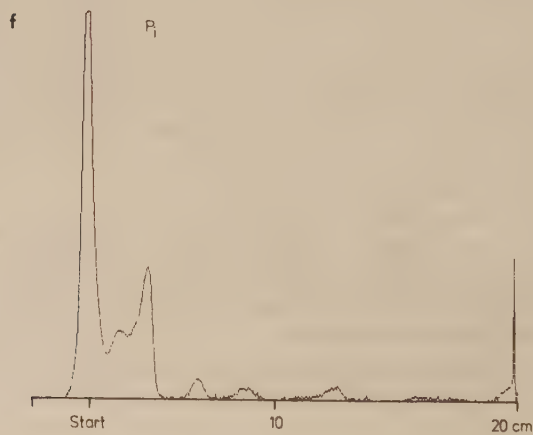
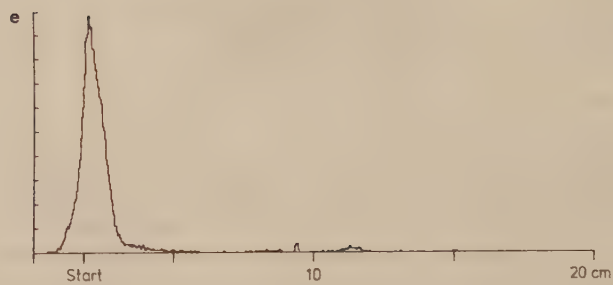
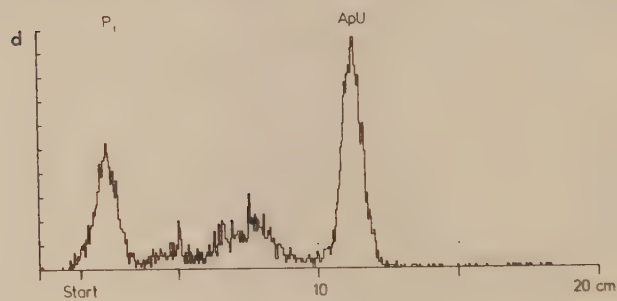
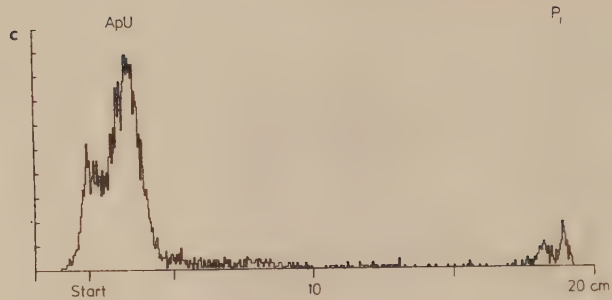


Fig. 9 Chromatographische Auftrennung nach Spaltung des markierten *W140 mit Pyrophosphatase und alkalischer Phosphatase

Die Markierung erfolgte wie in Fig. 8 a beschrieben. Nach der Spaltung von *W140 mit Proteinase K, Pyrophosphatase und alkalischer Phosphatase wurden die Produkte in vier verschiedenen Chromatographiesystemen aufgetrennt (s. Methoden). Bei Abbildung a-e wurde die Radioaktivität direkt gemessen und automatisch aufgezeichnet, während es sich bei f um eine densitometrische Auswertung der Autoradiographie handelt (s. Methoden). Die Position von unmarkiertem Vergleichs-ApU, das den jeweiligen Läufen zugesetzt worden war, ist durch einen Pfeil markiert; P_i wurde aufgrund der bekannten R_f -Werte gekennzeichnet. In den " P_i "-Gipfeln sind möglicherweise noch andere komigrierende Produkte enthalten. Bei der an der Auftragsstelle zurückbleibenden Radioaktivität handelt es sich um nicht vollständig verdaute oder unbekannte höhermolekulare oder höhergeladene Verbindungen. Die Radioaktivität bei etwa 8 cm im Bild a (s. Kap. 2.1.3.2.; Trinukleotide) und bei 6-9 cm in Bild d wurden hier nicht identifiziert.

- a PEI-Cellulose / 0,16 M LiCl
- b PEI-Cellulose / 0,5 M NaHCOO pH 3,6
- c Whatman 3MM / Fließmittel III
- d Silicagel 60 / Isopropanol : konz.NH₃ : H₂O (6:3:1)
- e PEI-Cellulose / 0,16 M LiCl, *W140 nur mit Proteinase K und Pyrophosphatase behandelt
- f PEI-Cellulose / 0,16 M LiCl, *W140 nur mit Proteinase K und alkalischer Phosphatase behandelt



2.1.3.2. Nachweis von ApApU, ApUpA und ApUpU

In einem weiteren derartigen Experiment - sowohl mit AB-ADB als auch mit pHB-ATP als Derivat - konnte nach der Auftrennung in PEI-Cellulose / 0,16 M LiCl Radioaktivität eluiert werden, die in zwei Systemen mit unmarkiertem ApApU wanderte, sich resistent gegen Ribonuklease A, gegen alkalische Phosphatase und gegen eine aufeinanderfolgende Verdauung durch diese beiden Enzyme erwies. Durch Ribonuklease T2 dagegen wurde sie vollständig abgebaut und chromatographierte wie Ap (Fig. 10 B).

Da kein ATP zugegeben wurde, ist diese Identifizierung von ApApU überraschend. Das in diesem Fall zur Elongation nötige ATP dürfte als Verunreinigung in der Derivatpräparation bzw. im kommerziellen [α - 32 P]UTP vorhanden sein; eventuell können auch die Derivate selbst Substrate sein (s. Anhang).

Ein Experiment mit pHB-ATP, unmarkiertem UTP und [α - 32 P]ATP an poly[d(A-T)] als Matrize führt nach Kap. 2.1.2. (Fig. 7 h) ebenfalls zur Markierung. Diese sollte auf ein gebundenes Trinukleotid der Struktur W140~ApU*pA zurückzuführen sein. Die Verdauung von derartig markiertem *W140 mit Ribonuklease T2 ergab auch erwartungsgemäß mit Up wandernde Radioaktivität. Nach einer Spaltung mit Pyrophosphatase und Phosphatase konnte jedoch nur freies P_i nachgewiesen werden (ohne Belege). Dieser Befund weist darauf hin, daß RNase A, die vor der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Verdauung des freien RNA-Hintergrundes eingesetzt worden war, auch mit dem nativen Enzymkomplex kovalent verbundene Up-N-Bindungen spaltete und deshalb kein Trinukleotid der Sequenz ApUpA erhalten wurde.

Aufgrund dieser Überlegung wurde ein Ansatz mit pHB-ATP, mit Plasmid-DNA als Matrize und [α - 32 P]UTP auch ohne anschließende RNase A-Behandlung durchgeführt.

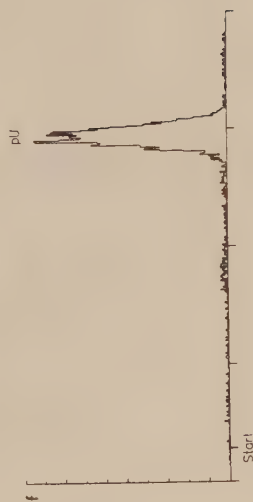
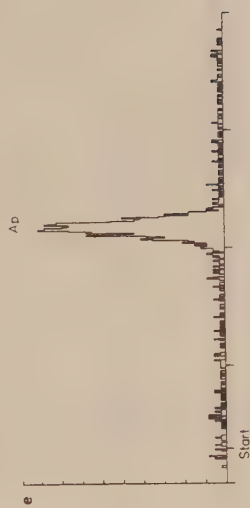
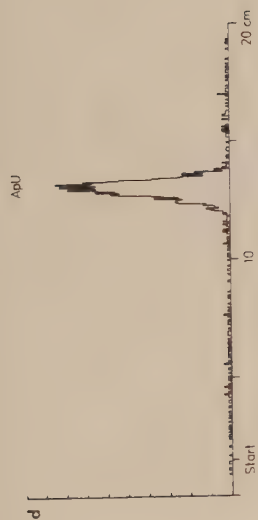
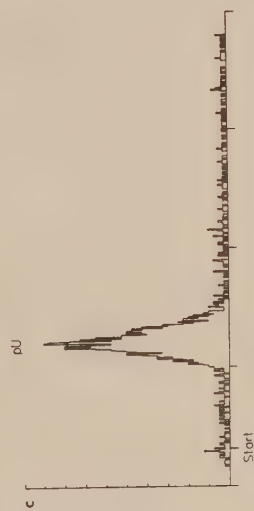
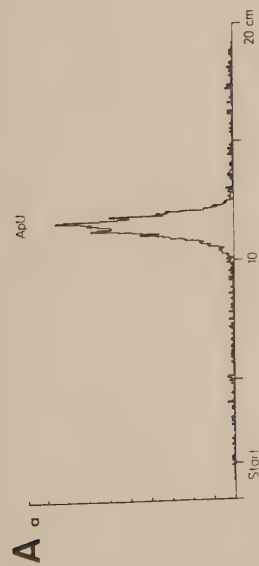
Fig. 10 Rechromatographie und enzymatische Spaltung der Affinitätsmarkierungsprodukte ApU-, ApApU-, ApUpA- und ApUpU

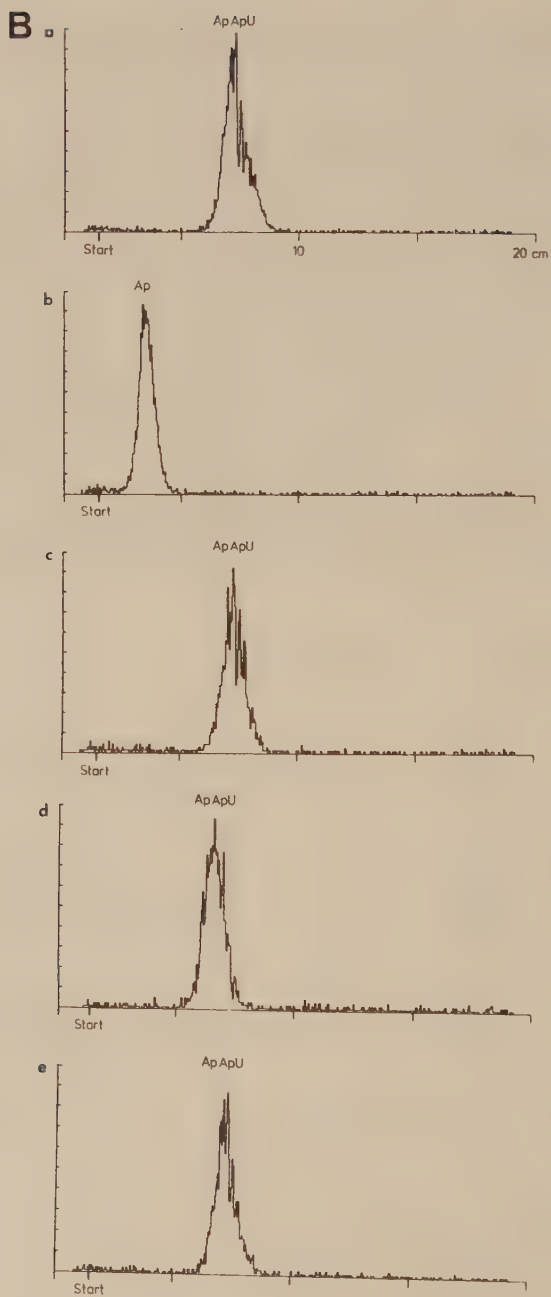
Die Markierung, die Elution und die Spaltungen von *W140 mit saurer Pyrophosphatase und alkalischer Phosphatase erfolgten wie in Fig. 8 a (Teile A,B: 0,5 mM AB-ADP als Derivat, 0,2 μ M [α - 32 P]UTP, cg2RR329 als DNA-Matrize; RNase A-Behandlung nach dem Markierungsansatz) bzw. wie in Fig. 8 b (Teile C,D: 0,5 mM pHB-ATP als Derivat, 0,7 μ M [α - 32 P]UTP, cg2RR329 als DNA-Matrize; keine RNase A-Nachbehandlung) beschrieben.

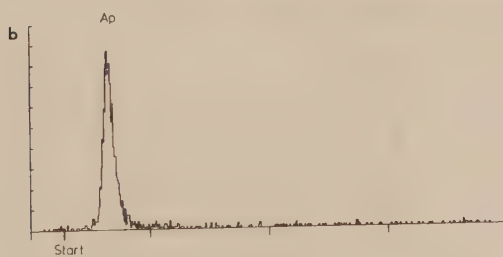
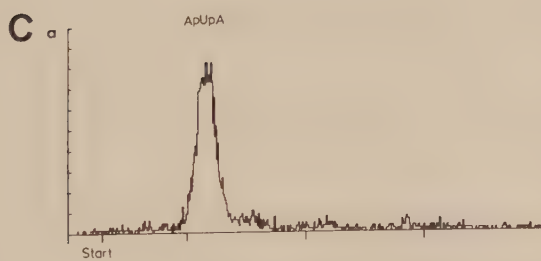
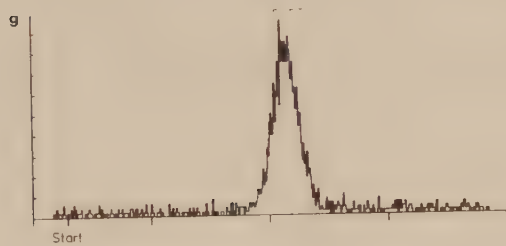
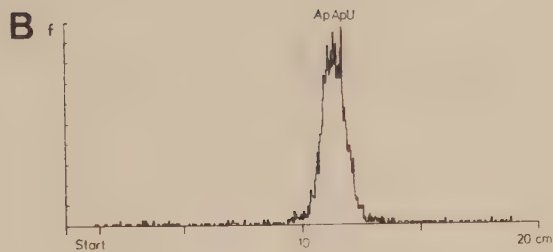
Nach der Chromatographie dieser Ansätze im System PEI-Cellulose / 0,16 M LiCl wurde Radioaktivität aus Bereichen eluiert, die den Laufwerten von ApU oder einem der Trinukleotide entsprachen (s. Methoden).

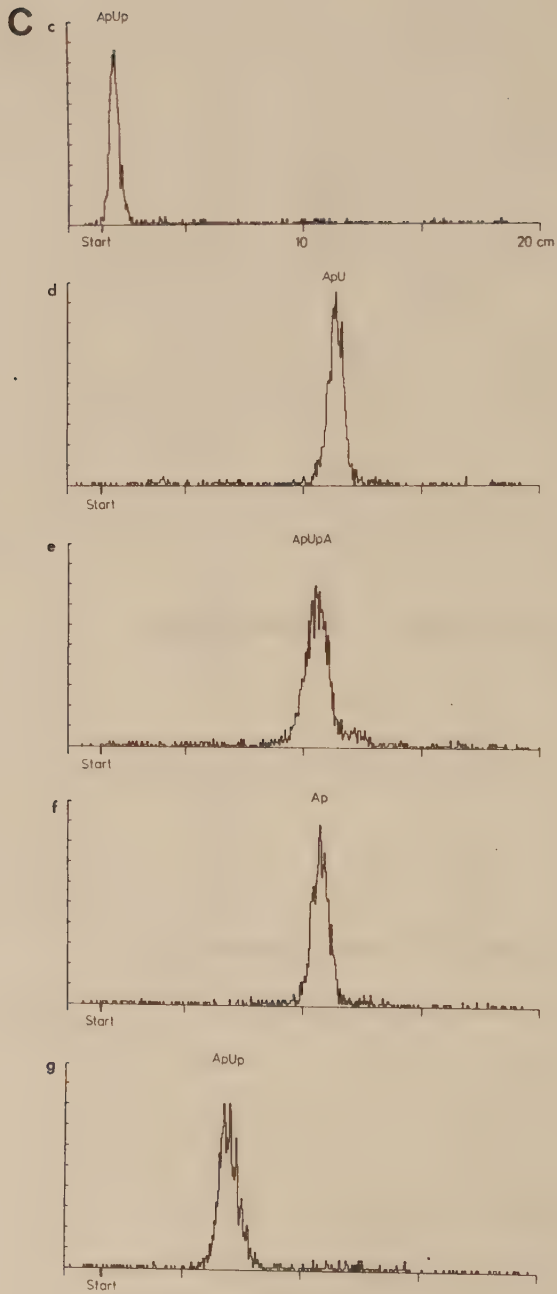
Diese Eluate wurden ohne weitere Verdauung oder mit den genannten Enzymen behandelt erneut auf PEI-Cellulose mit 0,16 M LiCl (L) oder 0,5 M NaHCOO pH 3,6 (N) als Laufmittel chromatographiert. Die Radioaktivität wurde direkt gemessen und automatisch aufgezeichnet (s. Methoden). Die absoluten Ordinatenwerte befinden sich im Bereich von 2000 bis 9000 lpm. Die Pfeile bezeichnen die UV-Absorption der angegebenen unmarkierten Verbindungen, die zusammen mit der radioaktiven Probe chromatographiert wurden. Lediglich ApUpA und ApUpU waren nicht kommerziell erhältlich; ihre R_{AU} -Werte (auf ApU bezogenen R_f -Werte) wurden nach ihrer Synthese aus geeigneten radioaktiven Vorläufern bestimmt (s. Methoden).

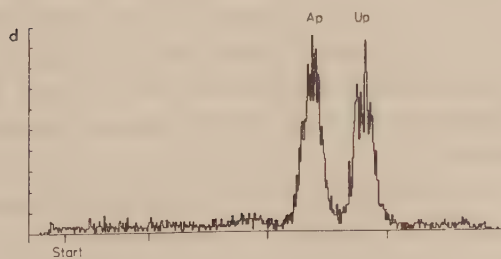
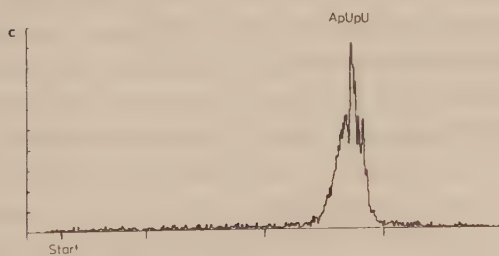
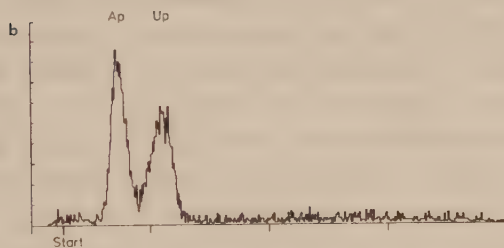
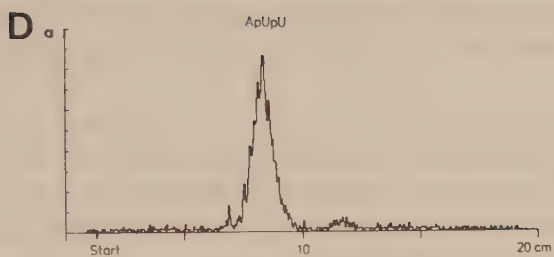
Eluat			PEI-Cellulose (Laufmittel)	Radioaktivität läuft wie UV-Absorption von, mit R_{AU} -Werten		
A	a,d	-	L, N	ApU	1,00	1,00
	b,e	+ RNase T2	L, N	Ap	0,21	0,81
	c,f	+ Phosphodiesterase I	L, N	pU	0,45	1,14
B	a,f	-	L, N	ApApU	0,55	0,82
	b	+ RNase T2	L	Ap	0,20	0,83
	c	+ RNase A	L	ApApU	0,55	
	d,g	+ RNase A, alk.Phos.	L, N	ApApU	0,53	0,80
	e	+ alk. Phosphatase	L	ApApU	0,55	
C	a,e	-	L, N	(ApUpA)	0,43	0,80
	b,f	+ RNase T2	L, N	Ap	0,20	0,83
	c,g	+ RNase A	L, N	ApUp	0,05	0,48
	d	+ RNase A, alk.Phos.	L	ApU	1,00	
D	a,c	-	L, N	(ApUpU)	0,66	0,98
	b,d	+ RNase T2	L, N	Ap + Up	0,21 + 0,40	0,82 + 1,02











Nach der Auftrennung des eluierten und mit Proteinase K, saurerer Pyrophosphatase und alkalischer Phosphatase verdauten *W140 im System PEI-Cellulose / 0,16 M LiCl wiesen jetzt zwei Banden R_{Au} -Werte (auf ApU bezogene R_{F} -Werte; s. Methoden) wie ApUpA bzw. ApUpU auf.

Nach der getrennten Elution der beiden Gipfel bestätigte die Rechromatographie im gleichen System und mit 0,5 M NaHCOO pH 3,6 als Elutionsmittel diese Befunde (Fig. 10 C a,e und D a,c). Die wie ApUpA laufende Radioaktivität wanderte nach Behandlung mit Ribonuklease T2 wie Ap, nach Ribonuklease A wie ApUp und nach darauf anschließender Verdauung mit alkalischer Phosphatase wie ApU (Fig. 10 C b,c,d,f,g).

Die wie ApUpU wandernde Radioaktivität wurde dagegen durch Ribonuklease T2 zu gleichen Anteilen in Ap und Up gespalten (Fig. 10 D b,d).

Ein Aliquot derselben Pyrophosphatase- und Phosphatase-Verdauung von *W140, die zum chromatographischen Nachweis von ApUpA und ApUpU führte, wurde über ein 25%iges Sequenzgel analysiert. Neben den starken ApU- und ApUpA/ApUpU-Banden sind noch schwächere Banden im Größenbereich von 7- bis 17-meren Nukleotiden zu erkennen; zumindest die langsameren Banden sind jedoch Pronase-sensitiv⁶ (Fig. 8 b,c). Das legt den Schluß nahe, daß es sich dabei um nicht vollständig verdaute Produkte der Struktur Peptid~ApX (mit X = U, UpA, UpU) handelt. Eine ähnliche Situation könnte für die verbliebenen Banden mit geringerer Mobilität als ApU vorliegen, die nach densitometrischer Messung zusammen etwa 20% der Radioaktivität im Vergleich zu den Di- und Trinukleotiden ausmachen.

Alternativ könnte es sich dabei um längere RNA-Moleküle

⁶Während Proteinase K noch Spezifität bei der Spaltung von Peptidbindungen zeigt, kann das aus verschiedenen Exo- und Endoproteasen bestehende Enzymgemisch Pronase bis zu einzelnen Aminosäuren abbauen (Ebeling *et al.*, 1974; Narahashi, 1970).

($\geq$ ca. 7mer) handeln; diese würden aber in einem molaren Vergleich mit den Di- und Trinukleotiden nur eine untergeordnete Rolle spielen, da sie eine größere Zahl an radioaktiven UMP-Resten enthalten müßten.

Quantitative Aussagen zum Verhältnis von ApU und den gefundenen Trinukleotiden lassen sich nicht machen, da die relativen Anteile in mehreren durchgeführten Versuchen stark variierten. Eine Ursache dafür dürfte zum einen der Einsatz sehr geringer $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ -Konzentrationen ($0,2 - 1,0 \mu\text{M}$) sein, wodurch eine möglichst hohe spezifische Radioaktivität erreicht werden sollte. Möglicherweise sind auch die ATP-Verunreinigungen und/oder die Substrateigenschaften der synthetisierten Derivate, die den Einbau eines AMP erlauben in unterschiedlichen Herstellungen nicht konstant (s. Anhang). Beide Parameter sollten einen Einfluß auf die Synthese und die Sequenz der Trinukleotide haben (s. Kap. 1.1).

Ein einziger Versuch mit einem definierten Zusatz von unmarkiertem ATP ($50 \mu\text{M}$) zusammen mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$, mit pHB-ATP als Derivat und poly[d(A-T)] als Matrize, zeigt ein ApU : ApUpA-Verhältnis von etwa 3 : 2 (ohne Belege). Dieser Hinweis soll nur bedeuten, daß ein beträchtlicher Anteil des kovalent gebundenen Startnukleotids auch dann nur zum Dinukleotid verlängert wird, wenn für die Trinukleotidbildung günstigere Bedingungen herrschen.

Entscheidend ist der durch diese Befunde gelungene Nachweis, daß die Radioaktivität durch die Katalyse von Phosphodiesterbindungen an die zweitgrößte Untereinheit des Weizenkeim-Enzyms gebunden wurde. Dabei konnten im Fall von Adennukleotid-Derivaten und $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ an Plasmid-DNA (cg2RR329) als Matrize das Dinukleotid ApU und die Trinukleotide ApApU, ApUpA und ApUpU nachgewiesen werden.

2.1.4. Radioaktive Spaltprodukte nach Proteolyse von *W140

Eine weitergehende, für die Topographie des aktiven Zentrums außerordentlich interessante Fragestellung ist die genauere Lokalisierung der Region(en), bzw. letztendlich der (des) Lysinreste(s) innerhalb der Polymerase-Untereinheit, die das durch die Katalyse der Phosphodiesterbindung markierte Aldehyd-Nukleotidderivat trägt (tragen). Es ist durchaus denkbar, daß in einer solchen Region alternativ mehrere Lysinreste oder auch mehrere durch die Faltung des Enzyms in der Aminosäuresequenz getrennte Regionen betroffen sein können, wenn sie nahe genug zum aktiven Zentrum liegen.

Strategien, die zur Klärung dieser Fragen führen, sollten auf Spaltungen des Polypeptids beruhen. Grachev *et al.* (1985; 1987a) konnten auf der Basis der bekannten Primärstruktur der *E. coli* β -Untereinheit und unter den Annahmen, daß das markierte Nukleotidderivat nur innerhalb eines einzigen kleinen Bereichs gebunden wurde und bei ihrer Spaltungsreaktion statistisch nur ein Schnitt pro Polypeptid erfolgte, eine Region mit vier Lysinresten als potentielle Bindungsstellen des Derivats feststellen (Grachev *et al.*, 1987b). Dieses Verfahren läßt sich nicht direkt auf die Weizenkeim RNA Polymerase II übertragen, da die Primärstruktur keiner Untereinheit bekannt ist (s. Diskussion).

Im Folgenden werden einige Experimente zur Proteolyse der eluierten Untereinheit *W140 und dazu auch eine Auftrennung der Spaltprodukte über ein 25% Sequenzgel beschrieben.

2.1.4.1. Intensive Verdauung mit Trypsin

Wenn bei einer möglichst vollständigen, spezifischen proteolytischen Spaltung der markierten Polymeraseuntereinheit nur ein kleines radioaktives Peptid beobachtet würde, könnte man daraus schließen, daß nur ein definierter Bereich die Markierung trug. Andernfalls ist keine Aussage möglich, da es sich entweder um von mehreren Regionen herrührende oder um unvollständige oder unspezifische Spaltprodukte handeln kann.

Ein weiteres Ziel einer intensiven Proteolyse ist die Isolierung eines möglichst kleinen Peptids aus *W140 und seine anschließende Mikrosequenzierung, um die unmittelbare Umgebung der Anheftungsstelle des markierten Nukleotidderivats auf Aminosäureebene zu beweisen.

Weizenkeim RNA Polymerase II (300 µg/ml) war mit 0,5 mM AB-ADP, 0,18 µM [α - 32 P]UTP (3000 Ci/mMol) und 75 µg/ml cg2RR329 als Matrixe markiert worden. Vor der Denaturierung und Auftrennung über ein SDS-Polyacrylamidgel wurde der Ansatz mit 6 µg/ml RNase A und 2,5 µg/ml DNase I behandelt. Die markierte Untereinheit *W140 wurde aus dem Gel elektroeluiert (s. Methoden).

Nach einer Aceton-Fällung des Eluats zur Entfernung von SDS (200-300 ng Protein; Schätzwert aufgrund der eingesetzten Polymerase-menge und der Ausbeute bei der Elution) folgte eine Verdauung mit 10 oder 100 ng Trypsin¹ 4 h bei 37°C (s. Methoden).

Die mit Harnstoff und SDS denaturierte Probe wurde anschließend über ein 8-25% SDS-Polyacrylamidgel (s. Methoden, veränderte Pufferzusammensetzung) aufgetrennt. Die Autoradiographie zeigt zwei Hauptbanden, die im Bereich von Mr 3 bis 4 k, jedenfalls deutlich schneller als der 6,5k-Marker (Fig. 11A) wandern. Trypsin baut also *W140 zu sehr kleinen Einheiten ab, wobei aber nicht nur ein einziges Produkt auftritt.

Da alle Produkte einer Proteolyse eine hybride Struktur Peptid~Oligonukleotid aufweisen sollten, wurde ein gleichartig durchgeführter Abbau mit Trypsin (100 ng Enzym) auch über ein 25% Sequenzgel (25% Polyacrylamid, 7 M Harnstoff, kein SDS), in dem üblicherweise Oligonukleotide nach Größe und Ladung aufgetrennt werden (s. Kap. 1.1) elektrophoretisch getrennt.

¹Trypsin sollte durch die Hydrolyse am Carboxyterminus von Lysin oder Arginin in kleine Einheiten spalten. Die hier und im Folgenden verwendete Präparation war mit L-1-Tosylamido-2-phenylethyl-chloromethyl-Keton (TPCK) behandelt, um eventuelle Chymotrypsin-Verunreinigungen zu eliminieren (s. Material). Sowohl mit 10 als auch mit 100 ng Enzym wurde das gleiche Spaltmuster erhalten (ohne Belege).

Fig. 11 Chromatographische Analysen nach Proteolyse der markierten Untereinheit *W140

- A Intensive Verdauung mit Trypsin: Auftrennung über ein SDS-Polyacrylamidgel**
 Die Untereinheit *W140 war nach einer Markierungsreaktion wie im Text beschrieben eluiert worden. Ein Aliquot (200-300 ng) wurde mit 100 ng Trypsin (TPCK-behandelt) 4 h bei 37°C verdaut und über ein 35 cm langes 8-25% SDS-Polyacrylamidgel mit erhöhtem Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid (37 : 1; s. Methoden; die Wanderungsstrecke des Bromphenolblau betrug 32 cm) aufgetrennt. Als Größenmarker wurden Lactatdehydrogenase mit Mr 36,5k, Trypsininhibitor 21,5k, Cytochrom c 12,5k und Aprotinin 6,5k verwendet (s. Material und Methoden).
- B Intensive Verdauung mit Trypsin: Auftrennung über ein Harnstoff-Polyacrylamidgel**
 Die Ansätze wurden nach den angegebenen Verdauungen und Denaturierung mit etwa 5 M Harnstoff über ein 25% Sequenzgel (7 M Harnstoff, kein SDS) aufgetrennt. Die Angabe der Position von ApU und pApU erfolgte annähernd aufgrund der bekannten Wanderungsgeschwindigkeiten (vgl. Kap. 1.1.1.).
- a *W140 stammt aus demselben Markierungsansatz wie in Fig. 11A. Verdauung von *W140 mit 100 ng Trypsin (TPCK-behandelt) wie in Fig. 11A
- b-e getrennter, aber analoger Ansatz zur Markierung von *W140
- b Verdauung von *W140 mit 50 ng Trypsin (TPCK-behandelt), 15 h, 30°C
- c wie b + 1,9 U alkalische Phosphatase
- d wie b + 10 µg Pronase, 6 h, 37°C
- e Verdauung von *W140 mit 10 µg Pronase, 15 h, 30°C
- C Partielle Verdauung von *W140 mit Chymotrypsin**
 Die Markierung und Elution erfolgte wie in Fig. 11A,B, jedoch mit 0,5 mM pHB-ATP anstelle von AB-ADP. Die elektrophoretische Auftrennung nach den angegebenen Verdauungen erfolgte über ein 15% SDS-Polyacrylamidgel. Rinderserumalbumin mit Mr 68k, Glutamatdehydrogenase 55,4k, Lactatdehydrogenase 36,5k, Trypsininhibitor 21,5k, Cytochrom c 12,5k und Aprotinin 6,5k dienten als Größenmarker (s. Material und Methoden).
- a vollständige Verdauung: mit Aceton-gefälltes *W140 wurde in 50 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM CaCl₂ aufgenommen und 30 min bei 30°C mit 40 ng Chymotrypsin verdaut
- b unbehandeltes *W140 in Puffer wie unter c
- c partielle Verdauung: 25 µl Eluat in Tris-Glycin-Elektrophorese-Puffer wurden mit dem gleichen Volumen einer Lösung mit 250 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,9% SDS, 20% Glycerin, 0,01% Bromphenolblau vermischt, 2 min in kochendem Wasser denaturiert und 10 min bei 37°C mit 100 ng Chymotrypsin inkubiert. Die Reaktion wurde nach Zusatz von SDS ad 1,6% und Mercaptoethanol ad 8,3% durch erneutes Kochen terminiert (Cleveland *et al.*, 1977).

A

-Start

-35,5

-21,5

-12,5

-6,5

BPhB

B**a**

-Start

1

2

3

4

5

6

7

AplU

BPhB

pAplU

b c d e**C****a****b****c**

-Start

12,0

-68

-55,4

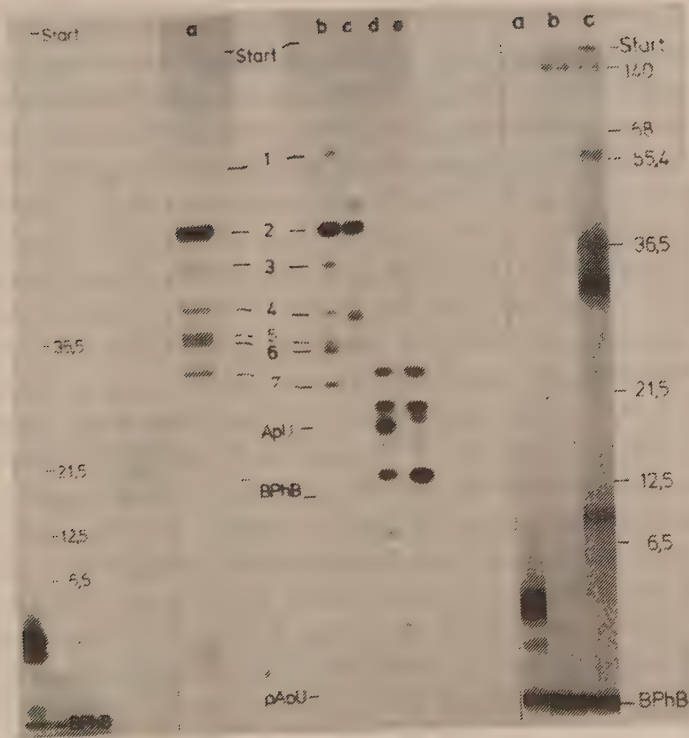
-36,5

-21,5

-12,5

-6,5

BPhB



Überraschenderweise ergab dieses System eine weitaus differenziertere und schärfere Auftrennung in insgesamt sieben Banden mit R_F -Werten (bezogen auf Bromphenolblau) von 0,26 (Bande 1) bis 0,74 (Bande 7). Die zweite Bande ($R_F = 0,41$) ist deutlich intensiver als alle übrigen (Fig. 11B a). Sowohl das Bandenmuster als auch die Intensitäten sind in einem getrennten Experiment mit einer längeren Verdauung mit 50 ng Trypsin über 15 h bei 30°C reproduzierbar (Fig. 11B a,b).

Zusätzliche Verdauungen mit Pronase und/oder alkalischer Phosphatase sollten Aussagen über die Natur der einzelnen Produkte ermöglichen. Alle Banden werden durch Pronase abgebaut und sollten deshalb tatsächlich einen Peptidanteil aufweisen. Eine zusätzliche Phosphatase-Resistenz bei dem Hauptprodukt und bei den Banden 4 und 5 ist ein Indiz für die erwartete Struktur Peptid~ppA*pU (oder ~Trinukleotid) (Fig. 11B c,d). Phosphatase-sensitive Banden sind möglicherweise auf eine Struktur Peptid~ppA*pUp zurückzuführen, die aufgrund der RNase A-Nachverdauung der Polymerase (s.o.) entstanden sein könnten (vgl. Kap. 2.1.3.). Ein unspezifisches Spaltprodukt kann dabei auch nicht ausgeschlossen werden. Der Vergleich einer Pronase-Verdauung des unbehandelten *W140 mit der eines zuvor bereits mit Trypsin behandelten *W140 spricht aber gegen das Auftreten von derartigen Artefakten. Bis auf eine prominente Bande findet man nämlich identische Spaltmuster (Fig. 11B d,e). Dies entspricht der Erwartung bei einer rein proteolytischen Spaltung, da die aus einem Gemisch aus Exo- und Endoproteasen bestehende Pronase bis zu einzelnen Aminosäuren abbauen kann (Narahashi, 1970), was ungeachtet einer vorangegangenen spezifischen Spaltung mit Trypsin zum gleichen Ergebnis führen sollte.

Diese Untersuchungen weisen speziell das Hauptprodukt der Trypsinolyse, die Bande 2, als ein interessantes Objekt für mögliche weiterführende Studien, u.U. sogar eine Mikrosequenzierung aus. Darüberhinaus sollte sich dieses für "Peptide" ungewöhnliche Elektrophorese-System allgemein zur verbesserten

Trennung und Isolierung von derartigen Spaltprodukten eignen. Das Problem einer Komigration von unmarkierten Peptiden, die bei einer Isolierung der radioaktiven Bande aus einem SDS-Polyacrylamidgel sicher vorliegt und eine Sequenzierung verhindern würde, ist in diesem System wahrscheinlich verringert, da in Abwesenheit von SDS reine Peptide, die nicht durch ein angehängtes Oligonukleotid negativ geladen sind, weniger gut oder gar nicht in einem 25% Sequenzgel wandern können².

Ehe man sich aber die Mühe³ macht ein derartiges Produkt in ausreichender Menge für eine Mikrosequenzierung zu isolieren, müßte man unbedingt zuvor an dem betreffenden Peptid ein Di- oder Trinukleotid, also die geforderte Struktur in Bezug auf ein gebundenes Oligonukleotid, nachweisen (s. Kap. 2.1.3.).

2.1.4.2. Partielle Proteolyse

Obwohl die Aminosäuresequenz von W140 nicht bekannt ist und damit die erwähnte, von Grachev *et al.* (1985, 1987b) bei *E. coli* RNA Polymerase entwickelte Methode zur Lokalisierung der Markierung nicht direkt übertragbar ist, kann man aus limitierten Spaltungen dennoch Information zur Eingrenzung der die Markierung tragenden Region gewinnen, besonders, wenn man zusätzliche Parameter wie etwa die Kennzeichnung des Aminoterminus (Jue & Doolittle, 1985; s. Diskussion) heranzieht.

²Falls man zur Markierung biotinyliertes UTP anstelle von [α -³²P]UTP einsetzt, könnte man das eluierte Spaltprodukt über eine Avidin-Säule ganz von jeglicher Kontamination durch komigrierende Produkte reinigen; dieser Aufwand ist aber u.U. bei einer Auftrennung in diesem System aus den genannten Gründen nicht notwendig. Im Hinblick auf eine mögliche Mikrosequenzierung ist außerdem von Vorteil, daß bei der Elution aus dem Gel im ElektrophoresePuffer (Tris, Borat, EDTA) keinerlei störendes Glycin beteiligt ist.

³Man muß berücksichtigen, daß höchstens wenige Prozent der eingesetzten Polymerase überhaupt eine Markierung tragen (s. Kap. 2.1.5.1.).

Ein häufig zur limitierten Proteolyse eingesetztes System wurde von Cleveland *et al.* (1977) entwickelt. Es eignet sich besonders für Proteine, die aus SDS-Gelen eluiert wurden, da die partielle enzymatische Spaltung direkt im Eluat in Gegenwart von SDS erfolgt.

Eine derartige Spaltung von *W140 mit 100 ng Chymotrypsin (10 min bei 37°C), das bevorzugt an Phenylalanin, Tyrosin oder Tryptophan spaltet (Smith, 1967), führt zu Hauptprodukten mit einer relativen Molmasse von etwa 55k, 36k, 31k und 8k, während eine Aceton-gefällte Probe in Abwesenheit von SDS vollständig bis zu niedermolekularen Banden kleiner als 6,5k abgebaut wird (Fig. 11C).

Würde eines dieser partiellen Spaltprodukte durch eine geeignete Vorbehandlung eine zusätzliche Kennzeichnung des Amino- oder Carboxyterminus tragen (s. Diskussion), so könnte man daraus ableiten, daß die Markierung innerhalb der gefundenen Größe eines solchen Spaltprodukts vom Amino- oder Carboxyterminus entfernt gebunden ist. Dabei spielt es sogar keine Rolle, ob das Enzym spezifisch oder unspezifisch gespalten hat.

Chemische Reagentien (BrCN, NH₂OH, N-Chlorsuccinimid) hätten dennoch bei einer partiellen Hydrolyse den entscheidenden Vorteil, daß die Spaltungen statistisch ablaufen, während Proteasen unter limitierenden Bedingungen nur an bevorzugten Stellen schneiden und somit eine weniger detaillierte Eingrenzung möglich ist.

Umgekehrt sind Proteasen für eine möglichst vollständige Verdauung geeigneter, da sie unter weitaus schonenderen Bedingungen arbeiten und man somit weniger Gefahr läuft, die Markierung selbst zu zerstören. So wird z.B. der größte Teil der Markierung von *W140 allein durch eine 18stündige Behandlung in 70% Ameisensäure abgespalten (ohne Beleg), d.h. unter Bedingungen für eine intensive BrCN-Spaltung (Gross, 1967).

2.1.5. Untersuchungen der zur Markierung führenden Reaktionsschritte

2.1.5.1. Umsetzung mit den Aldehyd-Derivaten

- Kinetik der Reaktion mit AB-ADP

Weizenkeim RNA Polymerase II wurde in Gegenwart von Plasmid-DNA (ple) mit 0,5 mM AB-ADP inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (2, 5, 10, 20, 30, 50 min) wurden Aliquots aus dieser Mischung entnommen, mit 10 mM NaBH₄ reduziert und anschließend mit [α -³²P]UTP umgesetzt. Nach der Auftrennung der Ansätze in einem SDS-Polyacrylamidgel zeigt die densitometrische Auswertung der Autoradiographie, daß schon eine 2 bis 5minutige Umsetzung mit dem Derivat die maximale Markierung von W140 bewirkt, d.h. sie kann durch längere Inkubation nicht mehr gesteigert werden. Das prinzipiell gleiche Ergebnis erhält man, falls die Inkubation

Reaktionszeit [min]	2	5	10	20	30	50
Markierung von W140 ^a	92	116	116	104	84	89
Markierung von W140 ^b	-	94	-	-	112	96

Tab. 4 Affinitätsmarkierung in Abhängigkeit von der Reaktionszeit mit AB-ADP

Die Werte für die Markierung von W140 wurden durch Densitometrie der Autoradiographie nach einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt (s. Methoden). Die Schwankungen der Werte für die Markierung bewegen sich erfahrungsgemäß im Bereich von 10%. Die angegebenen Werte sind nur innerhalb einer Reihe vergleichbar.

- a Die Umsetzung mit dem Derivat AB-ADP (0,5 mM) erfolgte in Gegenwart von Plasmid-DNA (ple). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben mit 2 μ g Polymerase entnommen, mit 10 mM NaBH₄ reduziert und dann mit 3,5 μ Ci [α -³²P]UTP (400 Ci/mMol) umgesetzt.
- b Im Gegensatz zu a wurde hier die DNA erst nach der Reduktion zusammen mit [α -³²P]UTP zugegeben.

mit dem Derivat in Abwesenheit von DNA durchgeführt wird und diese erst zusammen mit [α - 32 P]UTP zugesetzt wird (Tab. 4).

- Konzentration der Aldehyd-Derivate

Eine weitere Versuchsreihe hatte die Abhängigkeit der Intensität der Markierung von der Derivatkonzentration zum Ziel. Die Reaktion mit dem Aldehyd wurde, falls nicht anders angegeben, in Abwesenheit von DNA ausgeführt (vgl. Kap. 2.1.1.; 2.1.5.3.). Aus jedem Ansatz wurde ein Aliquot auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, um die Stärke der Markierung zu untersuchen. Parallel wurde je ein Aliquot entnommen, um die Enzymaktivität zu bestimmen; dieser Parameter sollte eine eventuelle Inaktivierung der Polymeraseaktivität durch das gebundene Oligonukleotid oder das Aldehydreagens selbst zeigen.

Es wurde nach folgendem Schema für AB-ADP, pHB-ATP und Pyridoxal-5'-Phosphat als Aldehyd-Derivate vorgegangen:

RNA Polymerase + Aldehyd-Derivat



NaBH₄



Plasmid-DNA + [α - 32 P]UTP



Affinitätsmarkierung :

Denaturierung

SDS-Polyacrylamidgel

RNA Polymerase-Aktivität :

+ NTP, denat. Kalbsthymus-DNA

Chromatographie

Pyridoxal-5'-Phosphat wurde deshalb in die Untersuchung einbezogen, da in früheren Arbeiten gezeigt wurde, daß es mit der Nukleotidbindungsstelle interferieren soll (Venegas *et al.*, 1973; Martial *et al.*, 1975; Modak, 1976; Valenzuela *et al.*; 1978; Bate-

man & Nicholson, 1984b). Es stellt weiter ein von den in dieser Arbeit verwendeten Derivaten unabhängiges Aldehydreagens dar, das nicht als Startnukleotid im Sinne einer funktionellen Affinitätsmarkierung dienen kann; damit könnte es aber Information über eine mögliche Inaktivierung durch ein Aldehydreagens allein liefern. Die Interpretation solcher Daten muß allerdings berücksichtigen, daß verschiedenartige Aldehydreagentien nicht mit den gleichen nukleophilen Aminogruppen reagieren müssen und deshalb unterschiedliche Effekte hervorrufen können.

Für AB-ADP als Derivat ergab sich im untersuchten Konzentrationsbereich von 0,008 bis 2,4 mM ein Maximum der Markierung bei etwa 0,5 mM AB-ADP. Dagegen war die Enzymaktivität durch die vorangegangene Markierungsreaktion bis zu diesem Punkt kaum beeinflusst. Sie nahm erst bei noch höheren Konzentrationen ähnlich wie die Markierung von W140 signifikant ab (Tab. 5 A). Wurde die Modifizierung mit AB-ADP in Gegenwart von DNA durchgeführt, so kam es bei 0,5 und 1,2 mM zu einem gleich starken Ausmaß an Markierung. Diese waren aber in Übereinstimmung mit anderen Versuchen (Kap. 2.1.1.; 2.1.5.3.) relativ zu den obigen Werten verringert. Gleichzeitig war die Enzymaktivität deutlich weniger gehemmt (Tab. 5 A).

Der Versuch mit pHB-ATP zeigte ein weit weniger ausgeprägtes Maximum, das bei 2,0 mM Derivat lag. Aber auch hier ist die Enzymaktivität an diesem Punkt nur um etwa ein Drittel und selbst bei 4,0 mM Derivat erst zur Hälfte inhibiert (Tab. 5 B). Dagegen ergab die Inkubation der Polymerase mit 0,5 bzw. 1,2 mM Pyridoxal-5'-Phosphat erwartungsgemäß keinerlei Affinitätsmarkierung, jedoch eine Inhibierung der Enzymaktivität um ein Drittel bzw. drei Viertel gegenüber den Referenzwerten. Diese starke Inhibierung - die von Bateman und Nicholson (1984b)

Tab. 5 Abhängigkeit der Markierung von W140 und der Aktivität der RNA Polymerase von der Konzentration von AB-ADP, pHB-ATP oder Pyridoxal-5'-Phosphat

A Einfluß der AB-ADP-Konzentration

5,5 µg RNA Polymerase wurden mit den angegebenen Derivatkonzentrationen und 10 mM NaBH₄ modifiziert und mit 1,5 µg ple und 10 µCi [α -³²P]UTP (400 Ci/mMol) umgesetzt. 2,0 µg davon wurden auf einem 5 - 18% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, 1,4 µg einem Aktivitätstest unterzogen.

B Einfluß der Pyridoxal-5'-Phosphat-Konzentration

Die Ansätze erfolgten wie unter A beschrieben entweder mit Pyridoxal-5'-Phosphat allein oder in der angegebenen Kombination mit AB-ADP.

C Einfluß der pHB-ATP-Konzentration

Die Markierungsreaktion erfolgte mit 4,3 µg RNA Polymerase, den angegebenen Derivatkonzentrationen, 4,4 mM NaBH₄, 1,5 µg ple (Zugabe immer nach dem Reduktionsschritt) und 24 µCi [α -³²P]UTP (300 Ci/mMol). 2,0 µg Enzym wurden auf einem 6 - 18% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, 0,4 µg in einen Aktivitätstest eingesetzt (s. Methoden).

Alle Ansätze wurden nach dem obigen Schema (S. 108) durchgeführt. Die Angaben zur Markierung von W140 beruhen auf einer densitometrischen Analyse der Autoradiographien nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen, wobei die Ansätze in den Teilen A, B oder C jeweils auf einem Gel aufgetrennt wurden und die relativen Angaben daher innerhalb dieser Teile verglichen werden können.

Die DNA (ple) wurde während der Modifizierung mit dem Derivat (+) oder nach dem Reduktionsschritt (-) zugegeben.

Die Angaben der Enzymaktivität beruhen auf Standardaktivitätstesten; Aktivität 100 bedeutet in den Teilen A und B 240 und im Teil C 420 nMol·min⁻¹·mg⁻¹ (s. Methoden).

Da die aufgeführten Werte jeweils einem konkreten Versuch entnommen sind, kann keine Fehlerbreite angegeben werden; sie bewegt sich erfahrungsgemäß bei den verwendeten Techniken bei +/- 10% bzw. +/- 2 relativen Einheiten (mit Ausnahme des Wertes 0). Die gefundenen Tendenzen sind reproduzierbar.

^a Vergleichsansatz mit gleicher Polymerase-Menge, aber ohne Markierungsreaktion.

	Derivat [mM]	Pyr.-5'-P [mM]	DNA	Markierung von W140 [rel.Einh.]	Aktivität [rel.Einh.]
A	0	-	-	0	92
	0,008	-	-	2	100
	0,04	-	-	17	106
	0,2	-	-	60	102
	0,5	-	-	100	103
	0,8	-	-	62	89
	1,2	-	-	24	63
	2,4	-	-	4	17
	0 ^a	-	-	-	111
	0,04	-	+	2	108
	0,5	-	+	9	105
	1,2	-	+	9	97
B	-	0	-	0	92
	-	0,5	-	0	65
	-	0,5	+	0	102
	-	1,2	-	0	24
	-	1,2	+	0	78
	0,3	0	-	100	100
	0,3	0,2	-	47	76
	0,3	0,5	-	23	48
	0,3	0,9	-	14	37
	0,3	2,1	-	3	17
C	0	-	-	0	90
	0,05	-	-	2	100
	0,2	-	-	28	105
	0,5	-	-	60	94
	0,75	-	-	66	79
	1,0	-	-	84	65
	1,5	-	-	94	81
	2,0	-	-	100	68
	2,5	-	-	93	49
	4,0	-	-	83	45

noch extremer angegeben wird - unterbleibt fast ganz, falls die DNA schon während der Reaktion des Aldehyds mit dem Enzym zugegen ist (Tab. 5 C). Dieser Befund bestätigt den Schutzeffekt von DNA, der auch im Fall von AB-ADP gezeigt wurde (Tab. 5 A).

Die kombinierte Umsetzung einer konstanten Menge von AB-ADP (0,3 mM) mit steigenden Mengen an Pyridoxal-5'-Phosphat (0 bis 2,1 mM) führte nicht nur zu einer starken Abnahme der Enzymaktivität, sondern auch der Affinitätsmarkierung (Tab. 5 C). Obwohl Weizenkeim RNA Polymerase II, wie damit am Beispiel von Pyridoxal-5'-Phosphat gezeigt, allein durch Aldehydreagentien stark inhibiert werden kann, geht die maximal erzielbare Affinitätsmarkierung durch AB-ADP oder pHB-ATP in gleichen Konzentrationsbereichen an Reagens höchstens mit einer geringen Hemmung der Polymeraseaktivität einher. In diesen Fällen würde man aber nicht nur durch die Umsetzung mit dem Aldehyd-Derivat eine Hemmung erwarten, sondern vor allem durch die kovalent im aktiven Zentrum gebundenen Di- und Trinukleotide. Eine derartige Blockierung des aktiven Zentrums kann daher nicht nachgewiesen werden. Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, daß eine Abschätzung des maximalen Anteils an markierten Enzymen aufgrund der eingesetzten Polymerase- und [α - 32 P]UTP-Mengen 1 bis höchstens 3% der Enzyme ergibt⁴. Es wurde nicht weiter untersucht, ob dies zur Erklärung des unerwarteten Befundes ausreicht; ähnliche Untersuchungen mit *E. coli* RNA polymerase, allerdings mit dem phosphorylierenden ATP als Derivat, ergaben, in Gegenwart sehr hoher [α - 32 P]UTP-Konzen-

⁴Bei der Abschätzung wurde die Annahme gemacht, daß reine Polymerase mit einer Molmasse von 600kD (Lewis & Burgess, 1982) vorliegt, 1 μ Ci eingesetzter Radioaktivität etwa $2 \cdot 10^6$ Ipm entsprechen und 1 Mol radioaktives UMP pro 1 Mol markiertem Enzym eingebaut werden. So führte etwa der Ansatz mit 2 mM pHB-ATP in Tab. 5C mit 2 μ g = 3,3 pMol Enzym zum Einbau von 61500 Ipm = 0,03 μ Ci in W140 (Szintillationsmessung der getrockneten Bande). Da [α - 32 P]UTP mit einer spezifischen Radioaktivität von 300 μ Ci/mMol verwendet wurde, entsprechen diese 0,03 μ Ci etwa 0,1 pMol. Es wurden also 0,1 pMol : 3,3 pMol = 3% der Enzyme markiert. Dieser Wert stellt unter den gemachten Annahmen und vorallem der Tatsache, daß keine Hintergrundkorrektur durchgeführt wurde sicherlich eine Obergrenze dar.

trationen als zweites Substrat, ebenfalls höchstens eine 65%ige Inhibierung der Polymerase-Aktivität, wovon ein Teil allein auf die Inkubation mit ATMP zurückzuführen ist (Smirnov *et al.*, 1981, 1984). Parallele Versuche zur Überprüfung der Markierung werden von diesen Autoren nicht angegeben.

~ Einflüsse von Aminogruppen und des pH

Da die Aldehyd-Derivate mit Aminogruppen reagieren, war es interessant die Einflüsse der Wasserstoffionenkonzentration und die von Aminogruppen tragenden Reagentien zu untersuchen. Eine Erhöhung des pH sollte zu einer erleichterten Deprotonierung von $R-NH_3^+/R-NH_2$ -Gruppen und damit zu besseren Bedingungen für die Iminbildung führen. Zusätzliche Aminogruppen könnten als Konkurrenten zu spezifischen $R-NH_2$ -Gruppen am Enzym auftreten und Aldehydreagens abfangen.

Die Untersuchungen dazu wurden von Stephan Glaser, im Fall der Amine auf meine Anregung hin, durchgeführt.

Die RNA Polymerase wurde mit pHB-ATP bei pH-Werten von 6,5, 7,5, 8,0 und 8,5 modifiziert⁵. Nach der Reduktion wurde der pH-Wert mit NaOH oder HCl bei 7,9 eingestellt und die Ansätze standardmäßig weiter verarbeitet. Die Versuche bei pH 6,5 und 7,5 zeigten das etwa gleich starke, bei pH 8,0 ein zweifaches und bei pH 8,5 ein sechsfaches Ausmaß an Markierung. Gleichzeitig stieg in diesem Bereich auch die Aktivität des Enzyms um das Doppelte, wenn ein Aliquot nach der Reduktion und Rückstellung des pH auf 7,9 getestet wurde (Glaser, 1987).

Somit läßt sich hier nicht entscheiden, ob die Zunahme der Markierung von W140 nur mit der allgemeinen Aktivitätssteigerung korre-

⁵Dazu wurde MES (pH 5,6) als Puffer gewählt; die benötigten Mengen an NaOH wurden vor dem Experiment mit Enzymproben, die Tris·HCl pH 7,9 enthalten, bestimmt. Nach der Reduktion wurden die entsprechenden fehlenden NaOH-Mengen bzw. HCl zu allen Ansätzen gegeben und pH 7,9 eingestellt, so daß dann wieder gleiche Verhältnisse vorlagen. Darauf wurden die Reaktionen mit [α -³²P]UTP durchgeführt (Glaser, 1987).

liert oder ob sie tatsächlich durch eine spezifische Deprotonierung einer das Derivat bindenden Aminogruppe eingetreten ist. Viele Enzympräparationen, auch die Weizenkeim RNA Polymerase II, enthalten Tris(hydroxyethyl)aminomethan ($\text{HOCH}_2)_3\text{C-NH}_2$ als Pufferbestandteil und Ammoniumsulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Deshalb wurde deren Einfluß und darüberhinaus auch der des Tetramins Spermin⁶ $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$ auf die Markierungsreaktion untersucht.

Dazu wurde Weizenkeim RNA Polymerase II gegen 50 mM HEPES·NaOH / 150 mM NaCl (DTT, EDTA, Brij und Ethylenglycol unverändert, s.S. 21) dialysiert, um das enthaltene Tris und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zu entfernen. Der erneute Zusatz von Tris oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (bis jeweils 30 mM)⁷ zum Markierungsansatz blieb ohne signifikante Auswirkung auf die Markierung von W140 gegenüber dem Amin-freien Enzympräparat. Bereits ab einer Konzentration von 3 mM Spermin findet man jedoch eine Abnahme der W140-Markierung (Glaser, 1987).

Interessanterweise beobachtete Modak (1976) bei der Untersuchung von DNA Polymerasen keinen Einfluß von Tris (bis 100 mM) oder Lysin (bis 20 mM) auf die Inaktivierung durch das Aldehydreagens Pyridoxal-5'-Phosphat, während Martial *et al.* (1975) in ähnlichen Experimenten mit RNA Polymerasen einen Schutzeffekt durch Tris, Ethylendiamin oder Lysin (50 mM) zeigen konnten, der auf ein Abfangen des Aldehydreagens durch die Iminbildung mit dem zugesetzten Amin beruht.

Im Fall der Affinitätsmarkierung mit 5'-Aldehyd-Nukleotidderivaten muß man die eindeutige Substratanalogie hervorheben. Dies sollte

⁶Spermin bildet aufgrund seiner positiven Ladungen Komplexe mit DNA.

⁷Höhere Konzentrationen wurden nicht getestet; in einem Standardansatz werden durch die Enzympräparation 10 - 15 mM Tris und 30 - 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eingebracht.

ermöglichen, daß ein Produkt aus Amin und Nukleotidderivat ebenfalls als Substrat akzeptiert wird und aufgrund der Reversibilität des Imins das am Derivat gebundene Amin von einer Aminogruppe des Enzyms verdrängt wird. Die Derivatbindung würde dann sowohl durch die natürliche Substrataffinität als auch die Iminbindung mit einer Gruppe am Enzym stabilisiert. Letztendlich wäre kein Einfluß durch das zugesetzt Amin erkennbar. Dieser Hypothese widerspricht allerdings der Befund mit Spermin. Möglicherweise wird durch die positiv geladenen weiteren Aminogruppen an diesem Tetramin die Substrataffinität eines Produkts aus Spermin und Nukleotidderivat stark herabgesetzt.

Eine alternative Deutung ist auf der Basis der pK_a -Werte möglich, nämlich 9,2 für NH_3 (March, 1977), 7,8 für Tris (37°C; Good *et al.*, 1966) und 9,8/ 9,1/ 6,8/ 3,8 für ein dem Spermin ähnliches Tetramin 1,2-Bis(2-aminoethyl)aminomethan (40°C; Perrin, 1965; Jonassen *et al.*, 1950). Eine Aminogruppe dieses Tetramins unterscheidet sich also in seinem pK_a -Wert um drei bis sechs Größenordnungen von allen anderen Aminogruppen und ist in einem Ansatz bei pH 7,9 weitgehend unprotoniert. Damit könnte ein Abfangen des Aldehydderivats durch ein solches Tetramin bei einem Markierungsexperiment ein deutlich stärkeres Ausmaß annehmen. Zusätzlich könnten die zwei bis drei positiven Ladungen am Tetramin, die ansonsten einen nukleophilen Angriff des Moleküls an einer Aldehydgruppe erschweren sollten im Fall des negativ geladenen Nukleotidderivats sogar zu einer Stabilisierung des Produkts beitragen, die die diskutierte Freisetzung des Nukleotidderivats aufgrund der Reversibilität des Imins verhindert. Dadurch könnte die Inhibierung der Affinitätsmarkierung durch Spermin erklärt werden.

2.1.5.2. Einfluß der $NaBH_4$ -Reduktion

Der Einfluß von $NaBH_4$ auf die enzymatische Aktivität erwies sich als gering. Weizenkeim RNA Polymerase II, die zuvor mit 2,5 bis 10 mM $NaBH_4$ behandelt worden war, zeigte im Höchstfall eine 25%ige

Hemmung (Tab. 5). Dennoch stellte sich heraus, daß die Reduktionsbedingungen noch schonender gestaltet werden können ohne dabei eine Verringerung der Intensität der Markierung in Kauf zu nehmen. Eine Konzentrationsabhängigkeit ergab, daß sogar weniger als 1/20 der von Grachev *et al.* (1986a, 1987) für *E. coli* RNA Polymerase beschriebenen (10 mM, 37°C, 30 min) NaBH₄-Konzentration ausreichen, um dieselbe Intensität an Markierung von W140 zu erhalten. Ebenso hatte eine Reduktion bei 0°C oder die Verkürzung der Reduktionszeit auf 10 bis 15 min oder die Verwendung von frisch verdünntem NaBH₄ aus einer eingefrorenen Stammlösung (1 M NaBH₄, 0,5 M NaOH, -70°C; Rieger, 1976) keine signifikanten Unterschiede der Markierung zur Folge (ohne Belege).

Diese Befunde zeigen, daß die Weizenkeim RNA Polymerase II gegenüber der NaBH₄-Behandlung überraschend unempfindlich ist und aber auch, daß die Affinitätsmarkierung mit äußerst geringen Mengen an NaBH₄ erreicht werden kann. Diese Kenntnis ist von großem Wert für Experimente mit anderen, u.U. empfindlicheren Polymerasepräparationen (s. Kap. 2.2; 2.5.).

2.1.5.3. Einfluß der DNA-Matrize

Wie bereits in 2.1.2 erwähnt wurde, kann jegliche Plasmid-DNA, aber auch linearisierte oder synthetische, copolymere DNA als Matrize bei der Affinitätsmarkierung fungieren. Dies korreliert mit den Befunden zur abortiven Dinukleotidsynthese (Kap. 1.1.). Der Frage, ob möglicherweise die aktuell verwendete DNA das Verhältnis und die Sequenz der gebundenen Di- und Trinukleotide beeinflusst, wurde nicht nachgegangen.

Die optimale DNA-Menge in Relation zur eingesetzten RNA Polymerase stimmte ebenfalls mit den Erfordernissen bei der abortiven Dinukleotidsynthese überein (Mosig *et al.*, 1985; Schäffner, 1984). So wurden routinemäßig 0,6 µg Plasmid ple (5,1 kbp), bzw. 0,8 µg Plasmid cg2RR329 (3,8 kbp) pro Ansatz mit 2 µg Polymerase einge-

A		Markierung von W140 [rel.Einh.]	
DNA-Menge [µg]			
0,33		82	
0,66		100	
1,0		101	
B		Markierung von W140 [rel.Einh.]	
DNA vor Reduktion gelöst in		DNA nach Reduktion gelöst in	
a	HEPES	-	33
	-	HEPES	99
	Tris	-	31
	-	Tris	100
	Tris	Tris	38
	Tris _{red}	-	45
	-	Tris _{red}	102
b	Tris	-	20
	-	Tris	100
	-	Tris ^a	100

Tab. 6 Abhängigkeit der Affinitätsmarkierung von der DNA-Zugabe

Die Angaben zur Markierung beruhen auf einer densitometrischen Auswertung der Autoradiographie nach SDS-Polyacrylamidgelen.

A Konzentration der DNA

2 µg RNA Polymerase wurden in einem Standardansatz mit 0,5 mM pHB-ATP modifiziert und in Gegenwart der angegebenen DNA-Mengen (cg2RR329) mit 0,1 µM [α -³²P]UTP (3000 Ci/mMol) umgesetzt (s. Methoden).

B Zeitpunkt der DNA-Zugabe

Teil a: 2 µg RNA Polymerase wurden mit 0,5 mM AB-ADP und 0,15 µM [α -³²P]UTP (3000 Ci/mMol) markiert. 0,55 µg (DNA) ple gelöst in 10 mM HEPES-NaOH pH 7,9/ 0,1 mM EDTA oder 10 mM Tris-HCl pH 7,9/ 0,1 mM EDTA wurden wie angegeben den Ansätzen zugesetzt. Im Fall von Tris_{red} wurde das in Tris gelöste Plasmid mit 10 mM NaBH₄ bei 37°C 30 min vorbehandelt und 1 Äquivalent HCl zum Ausgleich des pH addiert.

Teil b: in einem getrennten Experiment wurden 7,5 µg RNA Polymerase zusammen 20 min mit 0,4 mM AB-ADP inkubiert und in drei Reaktionsgefäße verteilt, zu einem wurde 0,55 µg ple gegeben und nach weiteren 10 min wurden alle drei mit 10 mM NaBH₄ reduziert. Nach der Reduktion wurde die gleiche DNA-Menge zu den übrigen und 0,1 µM [α -³²P]UTP (3000 Ci/mMol) zu allen Ansätzen addiert und weitere 30 min (bzw. 50 min bei ^a; vgl. Kap. 2.1.5.4.) inkubiert.

von W140, während sie mit einer geringeren DNA-Menge (0,33 µg) etwas schwächer war (Tab. 6 A).

Interessant ist die Beobachtung, daß es stets zu einer deutlichen Verringerung der Markierung von W140 durch die Anwesenheit von DNA vor dem Reduktionsschritt kommt, im gezeigten Beispiel um 63 +/- 8% (Tab. 6 Ba; s. auch Fig. 6). Das gilt auch, wenn die DNA zweimal zum Ansatz zugesetzt wurde, d.h. während der Modifikation und nach der Reduktion. Weiter ist die Schwächung unabhängig davon, ob die DNA in Tris- oder in HEPES-Puffer gelöst war oder ob sie vor der Zugabe zum Ansatz mit NaBH₄ (10 mM, 37°C, 30 min) umgesetzt worden war (Tab. 6). Eine Hemmung tritt sogar bei einer Vorinkubation der Polymerase mit dem Aldehyd-Derivat ohne Matrize auf, wenn diese dann aber noch vor dem Reduktionsschritt zugegeben wurde (Tab. 6 Bb).

Durch diese Versuche sollte zumindest ausgeschlossen sein, daß der Effekt durch störende Komponenten in der DNA-Lösung, wie z.B. Tris (Kap. 2.1.5.1.), oder durch eine Beeinflussung der Matrizenaktivität durch die NaBH₄-Behandlung hervorgerufen wird.

Darüberhinaus ergab die Umsetzung von kurzen (10 und 52 bp), 5'-[³²P] endmarkierten DNA-Fragmenten mit AB-ADP in Gegenwart oder in Abwesenheit von Weizenkeim RNA Polymerase unter den üblichen Salzbedingungen der Markierungsreaktion keine Veränderung der elektrophoretischen Mobilität der DNA in Polyacrylamid-Sequenzgelen (ohne Belege). Man findet also kein Abfangen des Aldehydreagens durch eine stabile, eine Denaturierung mit 80% Formamid (so wurden die DNA-Proben vor der Elektrophorese behandelt) überdauernde Bindung an die DNA. Möglicherweise interferiert die stark negativ geladene DNA dennoch mit der Iminbildung oder deren Stabilisierung durch die Reduktion. So wäre z.B. eine Erhöhung des pK-Wertes der Lysin-Aminogruppen, d.h. einer verstärkten Protonierung, durch die DNA in der Nähe des aktiven Zentrums und der

DNA-Bindungsstelle und die damit erschwerte Iminbildung plausibel oder auch eine ineffizientere Reduktion der Schiff-Base in einem kompakteren Komplex aus Enzym, Nukleotidderivat und DNA denkbar. Dabei gilt es jedoch noch die nicht triviale Beobachtung hervorzuheben, daß überhaupt eine korrekte Nukleotidbindung in Abwesenheit einer DNA-Matrize möglich ist (s. Kap. 2.5.2.2.).

2.1.5.4. Einfluß von [α - 32 P]UTP

Das Ausmaß der Markierung dürfte auch von der Dauer der Inkubation mit [α - 32 P]UTP, von seiner spezifischen Radioaktivität und seiner Konzentration abhängen.

Der erste Punkt scheint nicht von großer Bedeutung zu sein. Routinemäßig wurde 15 bis 20 min mit dem radioaktiven Nukleotid umgesetzt. Ein Vergleich einer 30 min mit einer 50 min dauernden Inkubation mit [α - 32 P]UTP ergab nach der densitometrischen Auswertung der Autoradiographie identische Werte für die Markierung von W140 (Tab. 6 Bb).

Die Erhöhung der Konzentration des UTP bewirkt eine Zunahme des markierten *W140. Dabei scheint jedoch ab etwa 0,5 μ M UTP eine Sättigung erreicht zu sein (Tab. 7). Andererseits führt natürlich die Verwendung von [α - 32 P]UTP einer höheren spezifischen Radioaktivität zu einem stärkeren Signal. So ist hier z.B. im Fall von 0,13 μ M UTP die Zahl der markierten W140-Moleküle um den Faktor 4 kleiner als im Fall von 0,48 oder 0,96 μ M, aber das meßbare Signal ist aufgrund der höheren spezifischen Radioaktivität knapp zweifach erhöht (Tab. 7).

2.1.5.5. Einflüsse zusätzlicher, nicht-radioaktiver Nukleotide

Ein äquimolarer Zusatz von ATP zusammen mit dem Adenosin-Derivat verhindert die Affinitätsmarkierung von W140 an Plasmid-DNA mit

[α - 32 P]UTP		Markierung von	rel. Anzahl d. mar-	
Konz.	spez. Radioakt.	W140	kierten W140	
[μ M]	[Ci/mMol]	[rel. Einh.]	[rel. Einh.]	
0,064	3000	88	x 1	88
0,13	3000	100	x 1	100
0,38	1000	87	x 3	261
0,48	400	53	x 7,5	397
0,96	400	55	x 7,5	412

Tab. 7 Abhängigkeit der Markierung von W140 von der UTP-Konzentration und dessen spezifischer Radioaktivität

2,5 μ g RNA Polymerase wurden mit 0,5 mM pHB-ATP standardmäßig modifiziert und in Gegenwart von 0,66 μ g cg2RR329 mit den angegebenen Konzentrationen und spezifischen Radioaktivitäten an [α - 32 P]UTP umgesetzt. Diese Angaben beruhen auf den Herstellerdaten mit 3000 bzw. 400 Ci/mMol (s. Material), woraus sich UTP-Konzentrationen der radioaktiven Stammlösungen von 3,33 bzw. 25 μ M ergeben.

Die quantitative Abschätzung der Markierung erfolgte durch eine densitometrische Auswertung der Autoradiographie nach einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. In der letzten Spalte wurden diese Werte mit Berücksichtigung der eingesetzten spezifischen Radioaktivität umgerechnet bezogen auf die mit 3000 Ci/mMol erhaltenen Werte, d.h. die Angaben aus der dritten Spalte mit 1, 3 bzw. 7,5 multipliziert; sie stellen damit ein Maß für die Anzahl der markierten W140-Moleküle dar.

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ als zweitem Substrat (Grachev *et al.*, 1986a). Dies kann auf einer Konkurrenz von ATP mit dem Adenosin-Derivat (Grachev *et al.*, 1986a) beruhen, aber auch mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ im letzten Reaktionsschritt, da ATP an geeigneten Matrizen (Plasmid-DNA) ebenso als zweites Substrat eingebaut werden kann (Fig. 7 a). Die Zugabe von ATP zusammen mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ erst nach der Reduktion führt daher genauso zur Inhibierung der Markierung (ohne Belege). Deshalb kann an Plasmid-DNA als nicht-spezifischer Matrize eine eventuelle Konkurrenz im ersten Reaktionsschritt nicht nachgewiesen werden.

Dagegen sollte an $\text{poly}[\text{d}(\text{A-T})]$ als Matrize die direkte Konkurrenz eines anderen Nukleotids mit UTP als zweitem Substrat nicht möglich sein (vgl. Kap. 2.1.2.). Zusammen mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ nach dem Reduktionsschritt zugesetztes ATP (50 μM) verändert die Markierung von W140 nicht (Fig. 7 e,f). Somit wäre hier die Möglichkeit gegeben, allein die Konkurrenz von Nukleotiden mit dem Derivat im ersten Schritt zu verfolgen.

Auf Anregung von mir hat Stephan Glaser diese Untersuchungen eingehender durchgeführt, indem er verschiedene Konzentrationen (0,11 bis 2,2 mM) von GTP oder CTP zusammen mit pHB-ATP (200 μM) während der Modifizierung einsetzte und diese Versuche durch die entsprechenden Zugaben nach der Reduktion zusammen mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ und $\text{poly}[\text{d}(\text{A-T})]$ kontrollierte.

Es kam dabei, vor allem bei sehr hohen Nukleosidtriphosphat-Konzentrationen, zu einer Schwächung der Markierung von W140 in beiden Fällen, die aber voneinander nicht signifikant verschieden waren (Glaser, 1987).

Man muß daher davon ausgehen, daß keine Konkurrenz von Nukleosidtriphosphaten (Purin oder Pyrimidin) mit dem ATP-Derivat um die Bindung an die Weizenkeim RNA Polymerase II - in Abwesenheit von DNA - gefunden wird.

Möglicherweise kommt es während der parallelen Umsetzung mit dem Nukleotid-Derivat und einem Nukleosidtriphosphat zwar zur alternativen Bindung und damit zu einer Konkurrenz. Da die Bindung des

Derivats aber im Gegensatz zum natürlichen Substrat noch durch eine kovalente Iminbildung stabilisiert wird, sollte die Dissoziation eines Nukleotid-Derivats im Vergleich zum Nukleosidtriphosphat erschwert sein und dadurch letztlich eine Sättigung der Derivatbindung und scheinbar keine Konkurrenz resultieren.

2.1.6. Spezifische Markierung von W140 in nur teilweise gereinigtem Extrakt

In den bisherigen Experimenten wurde stets mit hochgereinigter RNA Polymerase gearbeitet. Aufgrund der hohen Selektivität ist es jedoch denkbar, daß eine Affinitätsmarkierung auch in nur teilweise gereinigten oder gar rohen Extrakten durchgeführt werden kann. Diese Möglichkeit wurde am System der Weizenkeim RNA Polymerase II untersucht, indem Proben aus den üblichen ersten Schritten bei der Enzymanreicherung (Rohextrakt, Polymin P-Eluat, Ammoniumsulfat-Fällung; s. Methoden) in Markierungsexperimente eingesetzt wurden. Dabei wurden jeweils drei verschiedene Proteinmengen getestet und eine eventuelle Markierung durch Vergleiche ohne Derivat, ohne den Reduktionsschritt oder durch die Zugabe von 1 µg/ml α -Amanitin kontrolliert. Die Reaktionszeiten wurden verkürzt und die Bedingungen schonender gewählt, um Abbaueffekte möglichst zu unterdrücken (Fig. 12).

Im Rohextrakt und im Polymin P-Eluat gelang es auf diese Weise nicht, eine spezifische Markierung von W140 oder anderen Peptiden nachzuweisen (Fig. 12 R und P). Dies gilt sowohl bei einer sofortigen Umsetzung als auch 48 h nach dem Aufschluß des Enzyms.

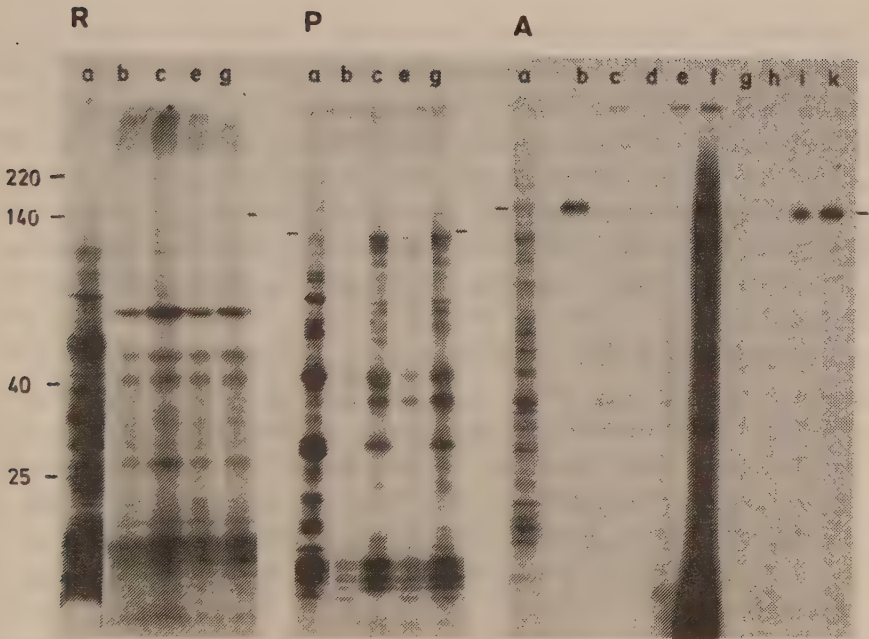


Fig. 12 Affinitätsmarkierung in teilweise gereinigtem Extrakt aus Weizenkeimen

Die verwendeten Extrakte entsprechen dem Rohextrakt und den ersten beiden Reinigungsschritten der üblichen Polymeraseanreicherung (Rohextrakt (R), Polymin P-Eluat (P), Ammoniumsulfat-Fällung (A); s. Methoden). Es wurden etwa 60 µg (R), 25 µg (P) oder 5 µg (A) Protein mit 0,5 mM pHB-ATP als Derivat 5 min bei 30°C inkubiert, im Eisbad abgekühlt und mit 2 mM NaBH₄ 10 min lang bei 0°C umgesetzt, 2 pMol [α -³²P]UTP und 0,8 µg Plasmid-DNA (cg2RR329; s. Material) zugegeben und weitere 5 min bei 30°C inkubiert. Danach erfolgte ohne Nachbehandlung mit RNase A, um nicht eine gleichzeitige Proteolyse einer eventuellen Markierung zu riskieren sofort die Denaturierung der Probe.

- a mit Coomassie G250 gefärbte Proteinbanden, die Pfeile zeigen die Position von W140 in einer Vergleichsprobe
- b vollständiger Ansatz zur Markierung (s. Text)
- c wie b ohne Derivat
- d wie b ohne exogene DNA
- e wie b ohne NaBH₄
- f wie b mit 0,5 mM ATP anstelle von pHB-ATP
- g wie b mit 1 µg/ml α -Amanitin
- h wie b + 0,75 µg Proteinase K, 30°C, 10 min
- i wie b + 0,15 µg RNase A, 30°C, 10 min
- k wie b + 0,075 µg DNase I, 30°C, 10 min

Dennoch werden zahlreiche radioaktive Banden gefunden; da keiner der Ansätze mit RNase A nachbehandelt wurde, handelt es sich dabei u.U. um ähnliche RNase-sensitive Produkte wie sie bei der Affinitätsmarkierung von W140 im Bereich von M_r kleiner als 30k auftraten. Derartige unspezifische oder spezifische Markierungen durch die Inkubation mit radioaktiven Nukleosidtriphosphaten sind auch von Schmidt und Hanna (1985) und als ADP-Bindung an die 25k-Untereinheit von Tabak RNA Polymerase II (Szopa & Wagner, 1984) beschrieben worden.

Dagegen konnte nach dem nächsten Reinigungsschritt, einer Ammoniumsulfat-Fällung, sogar nach einigen Tagen noch, fast ohne Hintergrund eine spezifische Markierung der gleichen Mobilität wie W140 gefunden werden, die alle Kriterien, die für das gereinigte Enzym aufgestellt worden waren (Kap. 2.1.1.) erfüllte. Unter der Fülle der mit Farbstoff angefärbten Proteinbanden konnte dagegen keine der markierten Polymerase-Untereinheit eindeutig zugeordnet werden (Fig. 12).

Bemerkenswert ist noch die Beobachtung, daß diese Markierung von W140 schwächer wurde, wenn mehr Protein eingesetzt wurde (ohne Beleg). Dieser negative Effekt durch die Erhöhung der Proteinkonzentration könnte auf einem vermehrten Abfangen des Derivats durch Reaktionen mit anderen Polypeptiden beruhen und/ oder auf abbauenden und die Polymerase-Aktivität inhibierenden Faktoren, die stärker zum Tragen kommen⁸.

Es bleibt festzuhalten, daß damit die Affinitätsmarkierung der Weizenkeim RNA Polymerase II in einem teilweise gereinigten Extrakt gezeigt werden konnte und diese Möglichkeit prinzipiell auch für andere Systeme bestehen sollte (s. Kap. 2.2.2.). Damit wäre der Nachweis der am aktiven Zentrum beteiligten Polymerase-Untereinheiten auch ohne Reinigung des entsprechenden Enzyms möglich; bei Verwendung von nicht denaturierenden Trennverfahren

⁸ Aufgrund dieser Überlegungen wurden die Versuche mit dem Rohextrakt und dem Polymin P-Eluat, allerdings wiederum erfolglos, auch mit den jeweils halben Proteinmengen durchgeführt.

könnte sogar die Identifizierung der undissoziierten Polymerasen möglich sein. Gleichzeitig weisen aber die Beobachtungen zur eingesetzten Proteinmenge und die nicht erzielte spezifische Markierung im Rohextrakt oder im Polymin P-Eluat auf eine Fülle von möglichen Problemen und Interferenzen durch andere enzymatische und inhibitorische Aktivitäten hin. Im Fall des Weizenkeim-Enzyms könnte sich z.B. der im Rohextrakt vorhandene Nukleinsäuregehalt (Jendrisak & Burgess, 1975) störend auf eine potentielle Markierung auswirken, da die Anwesenheit von DNA während der Modifizierung beim hochgereinigten Enzym eine Verringerung des Signals bewirkte (Kap. 2.1.1.; 2.1.5.3.).

Polymin P könnte eventuell direkt mit dem Aldehyd-Derivat interferieren oder die RNA Polymerase-Aktivität negativ beeinflussen, da der Ansatz ein Viertel des Gesamtvolumens Extrakt enthielt (vgl. Jendrisak & Burgess, 1975: Keine Beeinflussung des Aktivitätstests nur solange 1/50 Volumenanteil nicht überschritten wird).

Diese Schwierigkeiten können jedoch u.U. durch geeignete Gegenmaßnahmen, z.B. Protease-Hemmstoffe, noch kürzere Reaktionszeiten oder Vermeidung von Reagentien, die möglicherweise mit dem Derivat interferieren überwunden werden.

2.2. KERNEKTRAKT AUS TABAKZELLEN

Szopa und Wagner (1984) beschrieben eine Anreicherung von Tabak RNA Polymerase II ausgehend von isolierten Zellkernen. Nach der für das entsprechende Enzym aus Weizenkeim gewonnenen Erkenntnis über die Möglichkeit der Markierung in teilweise gereinigten Extrakten wurde hier versucht lediglich den vorgeschalteten Schritt der Anreicherung, die Kernisolierung, nachzuvollziehen und dann die Polymerase mit Hilfe der Affinitätsmarkierung in einem rohen Zellkernextrakt nachzuweisen.

Die Kerne wurden nach Willmitzer und Wagner (1981) aus den gleichen Suspensionskultur-Zelllinien isoliert, die auch Szopa und Wagner verwendeten, nämlich mit *Agrobacterium tumefaciens* transformierte *N. tabacum* Tumorzellen und die entsprechende habituierte Wildtyp-Zelllinie (s. Material und Methoden).

2.2.1. Solubilisierung von RNA Polymerase-Aktivität

Der Aufschluß der Kerne sollte möglichst schonend, einfach und in geringen Volumina erfolgen. Dafür bot sich die Parr-Bombe (s. Material) an, ein Stahlgefäß in dem Organellen oder Zellen in etwa 0,3 bis 15 ml Lösung bei hohen N_2 -Drücken äquilibriert werden können. Über ein Ventil ist das plötzliche Ablassen der Suspension auf Normaldruck möglich. Durch diese Dekompression lysieren die Partikel. Von besonderem Vorteil ist, daß dabei keinerlei allgemeine oder lokale Erwärmungen auftreten.

Ein Vorversuch zeigte, daß damit die Solubilisierung von α -Amanitin-hemmbarer RNA Polymerase-Aktivität aus den Kernen möglich ist (Tab. 8). Gleichzeitig wurden allerdings sowohl RNase- als auch DNase-Aktivitäten aus den Kernen freigesetzt, wie die Inkubation

Überstände	Aktivität [rel. Einh.]			
	ohne exogene DNA	mit 5 µg denatur. Kalbsthymus- DNA	+ 1 µg/ml + 10 µg/ml α-Amanitin	
A	1	7	6	4
B	14	29	23	14
C	79	100	52	32
D	7	10	5	4

Tab. 8 Solubilisierung von RNA Polymerase-Aktivität aus Tabakkernen

3,2·10⁷ Kerne aus *N. tabacum* wurden in 370 µl Puffer (20 mM (NH₄)₂SO₄, 40% Glycerin, 2 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 20 mM HEPES-NaOH, pH 7,7) gewaschen und in einer Ausschwingtischzentrifuge abzentrifugiert (-- Überstand A) (s. Material und Methoden). Der Rückstand wurde in 380 µl 60 mM (NH₄)₂SO₄ enthaltendem Puffer suspendiert und die Kerne erneut abzentrifugiert (-- Überstand B). Die Kerne wurden dann in 400 µl 120 mM (NH₄)₂SO₄-Puffer 45 min bei 100 bar N₂ äquilibriert und plötzlich auf 1 bar dekomprimiert (Parr-Bombe, s. Text). Nach einer weiteren 2minütigen Zentrifugation (-- Überstand C) wurde der Rückstand mit 160 µl Puffer ohne (NH₄)₂SO₄ versetzt und nach 10 min die Salzkonzentration auf 240 mM (NH₄)₂SO₄ in 200 µl Gesamtvolumen erhöht. Die Suspension wurde abzentrifugiert (-- Überstand D). Alle Manipulationen geschahen im Eisbad oder bei 5°C.

Die vier Überstände A, B, C und D wurden durch die Zugabe von EDTA und Puffer mit bzw. ohne (NH₄)₂SO₄ auf das gleiche Gesamtvolumen von 400 µl und Konzentrationen von 120 mM (NH₄)₂SO₄ und 0,2 mM EDTA gebracht. Danach wurden sie 45 min bei 150000 g zentrifugiert (SW56/ 0°C/ 35000 Upm/ ohne Bremsen). 12,5 µl dieser Lösungen wurden in 25 µl-Standardaktivitätstesten für RNA Polymerasen mit 5 µg denaturierter Kalbsthymus-DNA bzw. den angegebenen Abänderungen eingesetzt. 100 relative Einheiten entsprachen einem Einbau von 0,71 pMol [³²P]UMP in hochmolekulares Produkt (s. Methoden).

von Extraktverdünnungen mit ribosomaler 16/23S RNA aus *E. coli* bzw. Plasmid-DNA unter Transkriptionsbedingungen und eine anschließende Agarose-Gelelektrophorese zeigte (ohne Belege; Szopa *et al.*, 1983a,b).

2.2.2. Spezifische Markierung der zweitgrößten RNA Polymerase-Untereinheit

Etwa $2,6 \cdot 10^7$ Zellkerne aus *N. tabacum*-Zellen (s. Material und Methoden) wurden in Anlehnung an den in Tabelle 2.5 beschriebenen Versuch zweimal mit 500 μ l 30 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20% Glycerin, 0,125 mM DTT, 5 mM HEPES-NaOH pH 7,9 gewaschen, in 360 μ l 120 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20% Glycerin, 0,5 mM DTT und 20 mM HEPES-NaOH pH 7,9 suspendiert und 45 min bei 5°C und 100 bar N_2 äquilibriert. Nach der Dekompression auf Normaldruck wurde EDTA *ad* 0,2 mM und PMSF *ad* 0,25 mM (aus einer 100 mM Lösung in DMSO) zugesetzt und 30 min bei 110000 g abzentrifugiert (SW56/ 30 min/ 30000 Upm ohne Bremse). Der Überstand wurde sofort im Anschluß an die Ultrazentrifugation in einem Markierungsexperiment getestet (Fig. 13).

Die Autoradiographie nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigt mehrere Banden. Eine davon läuft etwas schneller als die 140kD-Untereinheit der Weizenkeim RNA Polymerase II und taucht nur in diesem vollständigen Markierungsansatz auf, nicht dagegen in einem Kontrollexperiment ohne Derivat oder ohne den Reduktionsschritt. Ansonsten treten keinerlei spezifisch markierte Banden auf. Die Zugabe von 1 μ g/ml α -Amanitin ergibt keine signifikante Hemmung des Signals (Fig. 13).

Diese radioaktive Bande ist also völlig abhängig von der Umsetzung mit dem Nukleotidderivat und dessen stabiler Bindung durch die Reduktion. Sie weist darüberhinaus eine elektrophoretische Mobilität auf, die im Einklang mit der von Szopa und Wagner (1984) berichteten Molmasse der zweitgrößten 135k-Untereinheit der Tabak RNA Polymerase II steht.

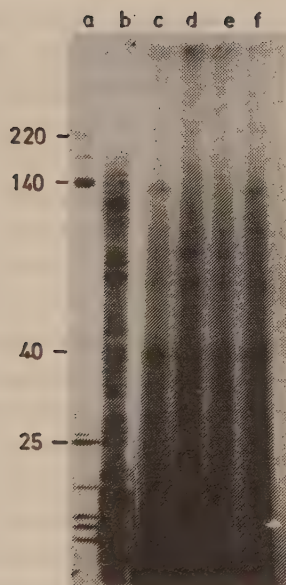


Fig. 13 Gelelektrophoretische Analyse der Affinitätsmarkierung in einem rohen Kernextrakt aus Tabakzellen

5 μ l Extrakt (etwa 17 μ g Protein) wurden im doppelten Gesamtvolumen umgesetzt. Einschließlich der im Extrakt vorhandenen Salze enthielten die Ansätze 75 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,2 mM MnCl_2 , 0,25 mM DTT, 10 mM HEPES-NaOH pH 7,9 und 20% Glycerin. Dies entspricht im wesentlichen den von Szopa und Wagner (1984) angegebenen optimalen Salzkonzentrationen.

Die Modifizierung erfolgte 4 min mit 0,5 mM pHB-ATP bei 30°C, Abkühlen auf 0°C und 10minütiger Reduktion im Eisbad mit 1 mM NaBH_4 . Nach Zugabe von 3,75 μ g denaturierter Kalbsthymus-DNA und 5 μ Ci $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ (400 Ci/mMol) wurden die Ansätze weitere 4 min bei 30°C inkubiert. Die Ansätze wurden über ein 6 - 18% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Färbung der Proteinbanden erfolgte mit Silber nach Bürk *et al.* (1983).

- a Proteinbanden der Weizenkeim RNA Polymerase II als Vergleich. Die Zahlen geben die relative Molmasse (10^{-3}) der entsprechenden Untereinheiten an.
- b Proteinbanden des Tabakkern-Extraktes
- c vollständiges Markierungsexperiment mit 0,5 mM pHB-ATP
- d wie c ohne Derivat
- e wie c ohne NaBH_4
- f wie c mit 1 μ g/ml α -Amanitin

Die Insensitivität dieser Markierung gegenüber 1 µg/ml α -Amanitin muß keinen Widerspruch zu einer RNA Polymerase II-Aktivität bedeuten, da z.B. auch für das Enzym aus Kalbsthymus weit höhere Hemmkonzentrationen für die Bildung der ersten Phosphodiester-Bindung im Gegensatz zur Gesamt-RNA-Synthese berichtet wurden (90% Hemmung der abortiven Initiation erst bei 25 µg/ml α -Amanitin (Hinrichsen *et al.*, 1985; Hodo & Blatti, 1977; Vaisius & Wieland, 1982). Die Art des Aufschlusses sollte die nukleoplasmatische RNA Polymerase II bevorzugen, worauf auch die im Vorversuch gefundene Enzymaktivität hinweist (Tab. 8, Überstand C). Selbst mit einer Ultraschallbehandlung der Kerne konnten Szopa und Wagner (1984) bei ihrer Anreicherung offensichtlich nur Polymerase II nachweisen. Alternativ kann die Möglichkeit einer anderen RNA Polymerase-Aktivität jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden.

In jedem Fall sollte es sich aber aufgrund der elektrophoretischen Mobilität um eine zweitgrößte RNA Polymerase-Untereinheit handeln, die durch die Affinitätsmarkierung in einem rohen Tabakzellkern-Extrakt spezifisch erfasst wurde, während die Proteinfärbung keinerlei derartige Zuordnung zuläßt (Fig. 13).

2.3. HEFE RNA POLYMERASEN I, II UND III

In *Saccharomyces cerevisiae* sind alle drei nukleären RNA Polymerasen I, II und III bekannt und gut charakterisiert (Buhler *et al.*, 1974; Dezélee *et al.*, 1976; Huet *et al.*, 1985; Sentenac & Hall, 1982; Sentenac, 1985). Sogar mehrere Gene sind bereits isoliert und zum Teil auch sequenziert worden (Young & Davies, 1983; Allison *et al.*, 1986; Riva *et al.*, 1986; Mann *et al.*, 1987; Sweetser *et al.*, 1987; Nonet *et al.*, 1987). Es war deshalb äußerst interessant, auch mit diesen Enzymen eine Affinitätsmarkierung zu versuchen. Damit wäre nicht nur eine zusätzliche Spezies, sondern vor allem auch mit den Polymerasen I und III zwei neue Enzymklassen erfasst, auf die diese Methode anwendbar ist. Die jeweils markierten Untereinheiten müßte man als homolog in funktioneller Hinsicht betrachten.

Die Experimente zur Affinitätsmarkierung der drei Polymerasen wurden in Zusammenarbeit mit Michel Riva (Centré d'Etudes Nucleaires, Saclay) in der Gruppe von A. Sentenac durchgeführt.

2.3.1. Hefe RNA Polymerase II

2.3.1.1. Spezifische Markierung der zweitgrößten Untereinheit mit 150k (B150)

Die Umsetzung der RNA Polymerase II aus *S. cerevisiae* geschah prinzipiell analog derjenigen mit Weizenkeim RNA Polymerase II. Der Modifizierung mit pHB-ATP und NaBH₄ folgte eine Inkubation mit [α -³²P]UTP und denaturierter Kalbsthymus-DNA als Matrice¹. Der denaturierte Ansatz wurde über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (s. Methoden).

Die Autoradiographie zeigt eine intensive radioaktive Bande mit der gleichen elektrophoretischen Mobilität wie die mit Silber an-

¹Denaturierte Kalbsthymus-DNA als Matrice ergab das weitaus intensivste Signal im Vergleich zu poly[d(A-T)] oder Plasmid-DNA (ohne Beleg).

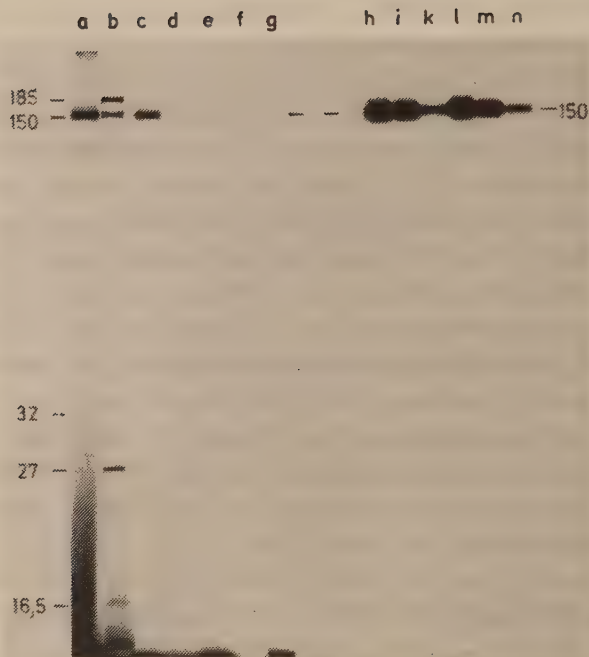


Fig. 14 Gelelektrophoretische Analyse der Affinitätsmarkierung der RNA Polymerase II aus Hefe

2 μg Polymerase wurden mit 0,5 mM pHB-ATP und 10 mM NaBH_4 modifiziert und darauf mit 1,3 μM $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ (140 Ci/mMol) und 1 μg denaturierter Kalbsthymus-DNA umgesetzt. Die Temperatur betrug bei allen Schritten 30°C und die Inkubationsdauer jeweils 30 min (s. Methoden und Material). Das Experiment zum Einfluß von α -Amanitin wurde von Michel Riva durchgeführt. Die Auftrennung der Ansätze erfolgte über zwei 11% SDS-Polyacrylamidgele (a-g und h-n).

- a vollständiges Experiment mit 0,5 mM pHB-ATP
- b Proteinbanden, gefärbt mit Silber (Bürk *et al.*, 1983). Die Zahlen geben M_r (10^{-3}) der bezeichneten Untereinheiten an.
- c Exp. a + 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A + 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNase I, 20 min
- d wie c ohne Derivat
- e wie c mit 0,5 mM ATP anstelle von pHB-ATP
- f wie c ohne DNA
- g wie c + 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteinase K, 30 min
- h,i,k wie c mit 0, 1 oder 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ α -Amanitin zusammen mit pHB-ATP
- l,m,n wie c mit 0, 1 oder 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ α -Amanitin zusammen mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ und DNA

gefärbte zweitgrößte Untereinheit der Polymerase II mit einer relativen Molmasse von 150k (B150). Wurde pHB-ATP oder nur der Reduktionsschritt (dies ohne Beleg) weggelassen oder das ATP-Derivat durch ATP ersetzt, so findet man keinerlei radioaktive Bande. Das gleiche gilt für eine Reaktion ohne DNA-Matrize (Fig. 14 a,b,d,e,f). Proteinase K baut die Radioaktivität vollständig ab, wogegen eine Verdauung mit RNase A und DNase I ohne Einfluß auf das Signal bleiben (Fig. 14 c,g).

Die α -Amanitin-Sensitivität ist in Übereinstimmung mit der RNA-Synthese-Aktivität des Enzyms weniger ausgeprägt als die der Weizenkeim RNA Polymerase II (Jendrisak & Guilfoyle, 1978; Sentenac, 1985; s. Kap. 2.1.1). So führt der Zusatz von 1 $\mu\text{g/ml}$ α -Amanitin zur Reaktion nur zu einer 40 bis 50%igen und von 10 $\mu\text{g/ml}$ zu einer knapp 90%igen Hemmung des Signals². Die Inhibierung ist unabhängig davon, ob α -Amanitin bereits während der Modifizierung mit dem ATP-Derivat zugegen ist oder erst danach zugefügt wird³ (Fig. 14 h-n).

Diese Kontrollen demonstrieren eindeutig, daß die Radioaktivität matrizenabhängig an ein Polypeptid und zwar selektiv an die zweitgrößte Polymerase-Untereinheit B150 gebunden wurde. Die Affinitätsmarkierung ist völlig abhängig von der Umsetzung mit dem Nukleotidderivat und seiner irreversiblen Fixierung durch die NaBH_4 Reduktion und von der enzymatischen Aktivität des Enzyms.

2.3.1.2. Nachweis von Phosphodiesterbindungen am markierten B150

In einem präparativen Experiment wurde Hefe RNA Polymerase II mit pHB-ATP und $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ an denaturierter Kalbsthymus-DNA markiert und vor der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit RNase A behan-

²Die quantitativen Angaben beruhen auf einer Szintillationsmessung der aus dem getrockneten SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnittenen gefärbten B150-Untereinheiten.

³Diese Beobachtung bedeutet (unter Vorwegnahme der Schlüsse aus den dargestellten Experimenten), daß ungeachtet der vorhandenen Bindung eines Startnukleotids im aktiven Zentrum α -Amanitin die Markierung hemmt, es also nur die Bindung des nächsten Substrats und/oder die Katalyse der Phosphodiesterbindung verhindert.

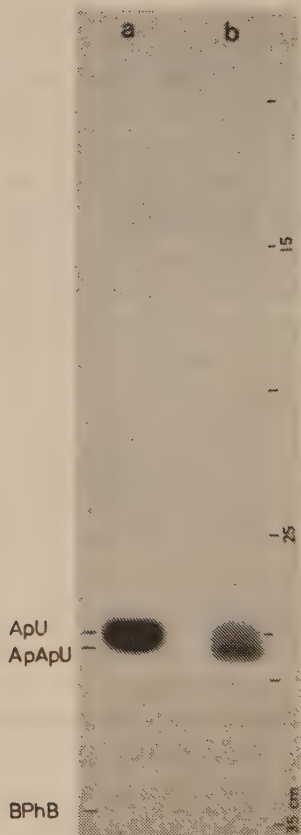


Fig. 15 Gelelektrophoretische Auftrennung nach Spaltung von *B150 mit Pyrophosphatase und Phosphatase

Die Elektrophorese erfolgte über ein 25% Sequenzgel (s. Methoden). Die Reaktion zur Markierung von B150 wurde mit 200 µg Hefe RNA Polymerase II, 0,5 mM pHB-ATP, 6 mM NaBH₄, 0,2 µM [α -³²P]UTP (3000 Ci/mMol) und 90 µg/ml denaturierter Kalbsthymus-DNA durchgeführt. Vor der Denaturierung und Auftrennung über ein SDS-Polyacrylamidgel wurde der Ansatz mit 7 µg/ml RNase A und 3 µg/ml DNase I, 15 min behandelt. Die Temperatur betrug bei allen Schritten 30°C. Das markierte B150 wurde aus dem SDS-Gel eluiert (s. Methoden und Material).

a [³²P]ApU als Vergleich (s. Methoden)

b Verdauung des eluierten *B150 mit Proteinase K, saurer Pyrophosphatase und alkalischer Phosphatase (s. Methoden)

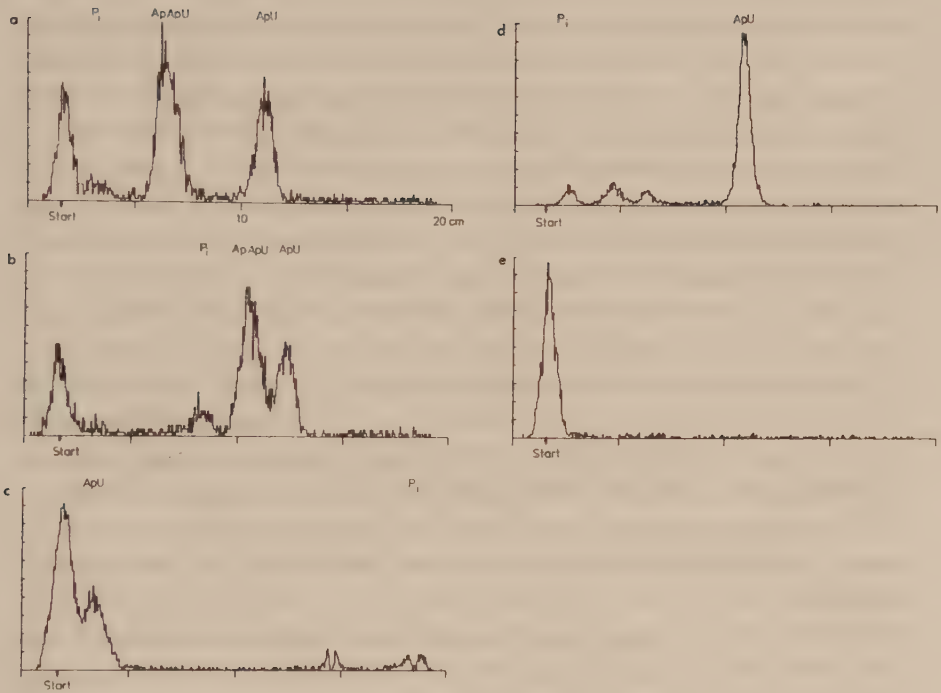


Fig. 16 Chromatographische Analyse nach Spaltung von *B150 mit Pyrophosphatase und Phosphatase

Die Markierung und Elution von *B150 erfolgte wie in Fig. 15 beschrieben. Nach der Spaltung von *B150 mit Proteinase K, saurer Pyrophosphatase und alkalischer Phosphatase wurden die Produkte in vier verschiedenen Chromatographiesystemen aufgetrennt (s. Methoden). Die Radioaktivität wurde direkt gemessen und automatisch aufgezeichnet (s. Methoden). Die Pfeile zeigen die Position der UV-Absorption von zugesetzten unmarkierten ApU und ApApU; P_i wurde aufgrund der bekannten R_F -Werte angegeben (s. Methoden).

- a PEI-Cellulose / 0.16 M LiCl
- b PEI-Cellulose / 0.5 M NaHCO₃ pH 3,6
- c Whatman 3MM / Fließmittel III
- d Silicagel 60 / Isopropanol:NH₃:H₂O (6:3:1)
- e PEI-Cellulose / 0.16 M LiCl, hier wurde *B150 nur mit Proteinase K und saurer Pyrophosphatase behandelt

delt, um eventuell gebildete freie RNA zu verdauen. Das markierte Bl50 wurde aus dem Gel eluiert, mit Proteinase K gespalten und dann mit saurer Pyrophosphatase (aus Tabak) und alkalischer Phosphatase (aus Kälberdarm) weiterverdaut. Dadurch sollte es zur Abspaltung und Dephosphorylierung der an das Polypeptid gebundenen Oligonukleotide kommen (s. Methoden; vgl. Kap. 2.1.3.; Fig. 5). Die chromatographische Analyse der Produkte in vier verschiedenen Systemen und die Elektrophorese in einem 25%igen Sequenzgel zeigte jeweils Radioaktivität mit den Laufeigenschaften von ApU. Der Anteil an der Gesamtradioaktivität beträgt nach der Trennung im System PEI-Cellulose / 0,16 M LiCl 27% (Fig. 15 und 16). Ein weiterer Gipfel - 44% der Radioaktivität auf PEI-Cellulose / 0,16 M LiCl - verhielt sich wie ApApU. In den Systemen Whatman 3MM und Silicagel ist zwar keine eindeutige Trennung und Zuordnung möglich, jedoch ist das Verbleiben der Radioaktivität nahe der Auftragsstelle (Whatman 3MM), bzw. die Komigration mit dem ApU-Gipfel (Silicagel)⁴ mit Referenz-ApApU konsistent (s. Material u. Methoden).

Knapp 10% wandern wie freies Phosphat und lediglich die restlichen 20% der Radioaktivität in der Nähe der Auftragsstelle blieben unidentifiziert. Vermutlich handelt es sich zum Teil um nicht vollständig verdaute Produkte (Fig. 16 a-d; s. Kap. 2.1.3.).

Wurde das eluierte *Bl50 nur mit Proteinase K und Pyrophosphatase behandelt, blieb die Radioaktivität in der Nähe der Auftragsstelle liegen (Fig. 16 e), da größere und höher negativ geladene Produkte in diesem Anionenaustauschersystem nur wenig wandern (vgl. pApU, Methoden).

⁴Der Anteil der Radioaktivität im ApU/ApApU-Gipfel auf Silicagel entspricht mit 75% der Summe der auf PEI-Cellulose getrennten ApU- und ApApU-Gipfel (vgl. Fig. 16), (27 + 44)% im Laufmittel LiCl und (27 + 45)% in NaHCO₃.

Die im System PEI-Cellulose / LiCl gut trennbaren, mit ApU bzw. ApApU wandernden Gipfel wurden mit 1 M TEAB pH 8,0 eluiert und erneut im gleichen System chromatographiert oder enzymatisch gespalten und daraufhin analysiert.

Die im System PEI-Cellulose / LiCl gut trennbaren, mit ApU und Bei der Rechromatographie verhielten sich beide Eluate wiederum wie die jeweils zugesetzten unmarkierten Referenzverbindungen ApU bzw. ApApU. Nach einer Verdauung mit RNase T2 zeigte die Radioaktivität in beiden Fällen die Mobilität von Ap, nach Spaltung mit Phosphodiesterase I wie pU (Fig. 17).

Alle diese Daten sind konsistent mit den Strukturen Bl50~A*pU und Bl50~ApA*pU⁵. Damit ist auch Hefe RNA Polymerase II mit einem kovalent gebundenem Startnukleotid zur Katalyse von ein oder zwei Phosphodiesterbindungen fähig.

Da kein ATP zugesetzt wurde, stammt das in ApApU eingebaute AMP vermutlich aus ATP-Verunreinigungen im eingesetzten Adenosin-Derivat und/oder [α -³²P]UTP oder aus dem Derivat selbst; so konnte auch für die Hefe RNA Polymerase II gezeigt werden, daß die pHB-ATP-Präparation in einer poly[d(A-T)]-abhängigen Reaktion in Gegenwart von [α -³²P]UTP als Substrat verwendet wird (M. Riva, pers. Mitteilung; s. Anhang).

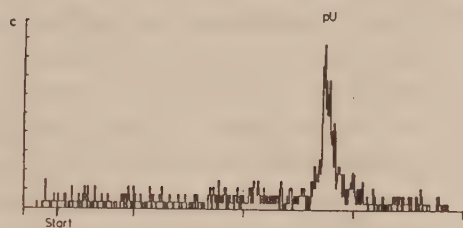
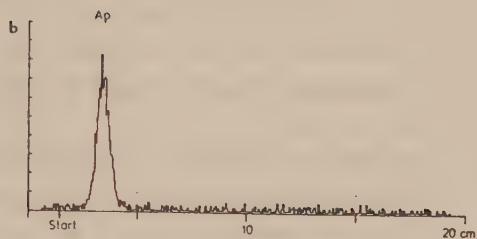
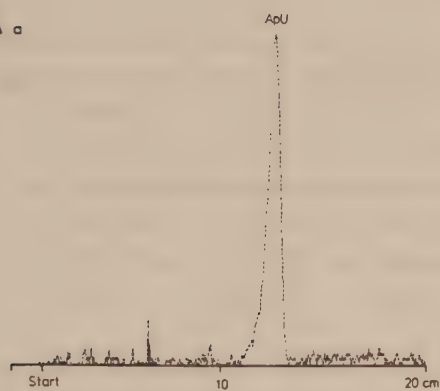
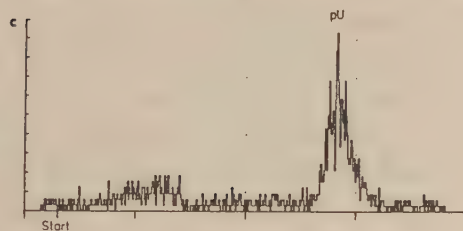
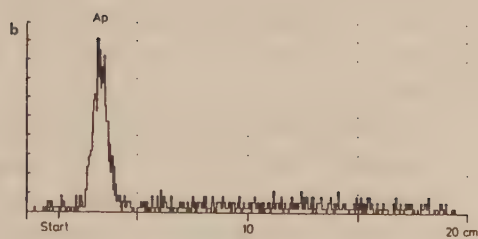
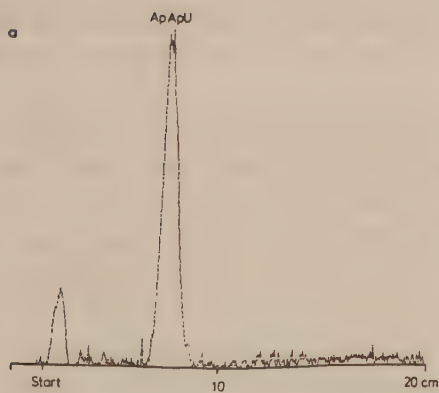
Unabhängig von den gefundenen Sequenzen ist dadurch auch direkt nachgewiesen, daß die Radioaktivität durch die Katalyse von Phosphodiesterbindungen in Form von Di- und Trinukleotiden kovalent an die zweitgrößte Untereinheit Bl50 gebunden worden war und damit eine funktionelle Affinitätsmarkierung vorliegt.

⁵Die bei Weizenkeim RNA Polymerase II gefundene Spaltung von ApUp~A, bzw. ~U-Bindungen durch die RNase A-Nachbehandlung läßt die Spekulation zu, daß das nachgewiesene ApU aus einem solchen Trinukleotid stammen könnte (vgl. Kap. 2.1.3.2.).

Fig. 17 Rechromatographie und enzymatische Spaltung der ApU- und ApApU-Gipfel

Die Markierung, die Elution und die Spaltung von *B150 mit saurer Pyrophosphatase und alkalischer Phosphatase erfolgte wie in Fig. 15 beschrieben. Nach einer Chromatographie im System PEI-Cellulose / LiCl wurde Radioaktivität aus den Bereichen eluiert, die den Laufwerten von ApU (A) oder ApApU (B) entsprachen (s. Methoden). Diese Eluate wurden ohne weitere Verdauung oder mit den Enzymen RNase A oder Phosphodiesterase I behandelt erneut auf PEI-Cellulose mit 0,16 M LiCl (L) oder 0,5 M NaHCOO pH 3,6 (N) als Laufmittel chromatographiert. Die Radioaktivität wurde direkt gemessen und automatisch aufgezeichnet; im Fall der nicht weiter behandelten Eluate A und B (A/a, B/a) handelt es sich um eine densitometrische Auswertung der Autoradiographie (s. Methoden). Die Pfeile bezeichnen die Position der UV-Absorption durch die angegebenen unmarkierten Verbindungen, die zusammen mit der radioaktiven Probe chromatographiert wurden; es werden auf ApU bezogene R_F -Werte (R_{AU}) angegeben (s. Methoden).

Eluat		PEI-Cellulose Laufmittel	Radioaktivität läuft wie UV-Absorption von, mit R_{AU} -Werten	
A	a	-	L	ApU 1,00
	b	+ RNase T2	L	Ap 0,19
	c	+ Phosphodiesterase I	N	pU 1,11
B	a	-	L	ApApU 0,56
	b	+ RNase A	L	Ap 0,20
	c	+ Phosphodiesterase I	N	pU 1,12

A**B**

2.3.2. Hefe RNA Polymerasen I und III

Interessant war nun, ob auch mit den beiden anderen nuklearen RNA Polymerasen I und III aus *S. cerevisiae* eine Affinitätsmarkierung möglich ist.

Die RNA Polymerasen I und III wurden mit pHB-ATP und anschließender Reduktion mit NaBH₄ kovalent modifiziert. Darauf folgte die Umsetzung mit [α -³²P]UTP; im Fall der Polymerase I diente denaturierte Kalbsthymus-DNA und bei Polymerase III poly[d(A-T)] als Matrize, die sich in Vorversuchen jeweils als günstig erwiesen hatten.

Die Ansätze wurden denaturiert und über SDS-Polyacrylamidgelelektrophoretisch getrennt (s. Methoden). Die Autoradiographie zeigt in beiden Fällen eine einzige radioaktive Bande, deren Mobilität mit der zweitgrößten Untereinheit der Polymerase I mit einer relativen Molmasse von 135k (Al35) bzw. der Polymerase III mit 128k (Cl28) übereinstimmte (Fig. 18 A a,b und B a,g).

Diese Bande ist jeweils nicht vorhanden, wenn das Derivat weggelassen oder durch ATP ersetzt wird oder wenn der Reduktionsschritt unterbleibt (letzteres ohne Beleg für Polymerase I). Das gleiche gilt für die Reaktion ohne DNA-Matrize (Fig. 18 A d,e,f und B b,c,e,f). Von Proteinase K wird die Radioaktivität vollständig abgebaut, während sowohl RNase A als auch DNase I die Signale unbeeinflusst lassen (Fig. 18 A c,h und B h,i,k).

Die Markierung von Al35 wird durch 0,4 mg/ml α -Amanitin schwach gehemmt (Fig. 18 A g). Noch höhere Konzentrationen des Toxins bis 2 mg/ml führen zu einer völligen Inhibierung des radioaktiven Signals (Riva *et al.*, 1987). Die geringe Sensitivität gegenüber α -Amanitin stimmt mit den Eigenschaften der Hefe RNA Polymerase I überein (Huet *et al.*, 1975).

Diese Kontrollen zeigen, daß es sich bei den gefundenen radioaktiven Banden jeweils um eine auf der enzymatischen Aktivität beruhenden, funktionellen Affinitätsmarkierung der zweitgrößten Untereinheiten Al35 bzw. Cl28 handelt.

Ein äquimolarer Zusatz von ATP zusammen mit dem Derivat führt zu einer Schwächung der Markierung von Al35 (Fig. 18 A i). Da in diesem Fall denaturierte DNA als unspezifische Matrize verwendet wurde, reflektiert dies möglicherweise nur eine Konkurrenz mit [α - 32 P]UTP als zweitem Substrat.

Bei der Polymerase III - in Gegenwart von poly[d(A-T)] als Matrize - erfolgt dagegen keine Inhibierung durch zugesetztes ATP, d.h. es tritt weder mit dem ATP-Derivat noch mit [α - 32 P]UTP eine Kompetition ein (Fig. 18 B d). Die Konkurrenz mit [α - 32 P]UTP könnte auch höchstens indirekter Natur sein, da die Komplementarität zur poly[d(A-T)]-Matrize als zweites Substrat nach dem Adenosin-Start ein UTP erfordern sollte. Darüberhinaus besteht lediglich die Möglichkeit, daß das nicht-radioaktive ATP als drittes Substrat in ein Trinukleotid eingebaut würde, was allerdings keinen Einfluß auf die Intensität der radioaktiven Markierung hätte.

Ein Versuch mit pHB-ATP als Derivat, nicht-radioaktivem UTP und [α - 32 P]ATP als Substraten und poly[d(A-T)] als Matrize führt in Übereinstimmung mit dieser Überlegung ebenfalls zu einer Markierung von Cl28, während der gleiche Ansatz ohne UTP keine radioaktive Bande zeigt (Fig. 18 B l,m,n). Das bedeutet, daß auch für die Hefe RNA Polymerase III die Katalyse von zwei Phosphodiesterbindungen mit kovalent gebundenem Startnukleotid nachgewiesen werden konnte.

Zusammenfassend mit den Ergebnissen über die Polymerase II trägt damit jeweils die zweitgrößte Enzymuntereinheit Al35, B150 und Cl28 der nukleären RNA Polymerasen I, II und III die Markierung, die durch die enzymkatalysierte Polymerisation von radioaktiven Nukleosidtriphosphaten an ein kovalent gebundenes Startnukleotid zustande kam. Bisherige Daten ergaben aufgrund von Kreuzreaktionsexperimenten mit Untereinheit-spezifischen Antikörper nur eine schwache immunologische Verwandtschaft von Al35, B150 und Cl28 (Huet *et al.*, 1982a, 1985; Sentenac, 1985). Die hier gefundenen Resultate gehen jedoch einen entscheidenden Schritt weiter, da sie eindeutig die Homologie der drei Untereinheiten auch in funktionseller Hinsicht belegen.

Fig. 18 Gelelektrophoretische Analyse der Affinitätsmarkierung der Hefe RNA Polymerasen I und III

2 bzw. 1,5 µg RNA Polymerase I bzw. III wurden mit 0,5 mM pHB-ATP und 10 mM NaBH₄ modifiziert. Darauf wurde der Polymerase I Ansatz mit 1,3 µM [α -³²P]UTP (140 Ci/mMol) und 1 µg denaturierter Kalbsthymus-DNA inkubiert, während im Fall der Polymerase III 1 µg poly[d(A-T)] als Matrize und, wenn nicht anders angegeben, 0,1 µM [α -³²P]UTP (3000 Ci/mMol) addiert wurden. Die Temperatur betrug bei allen Schritten 30°C (s. Methoden).

Die Auftrennung der Ansätze erfolgte über 11% SDS-Polyacrylamid-gele, die Proteinbanden wurden mit Silber (Bürk *et al.*, 1983; s. Methoden) gefärbt.

A RNA Polymerase I

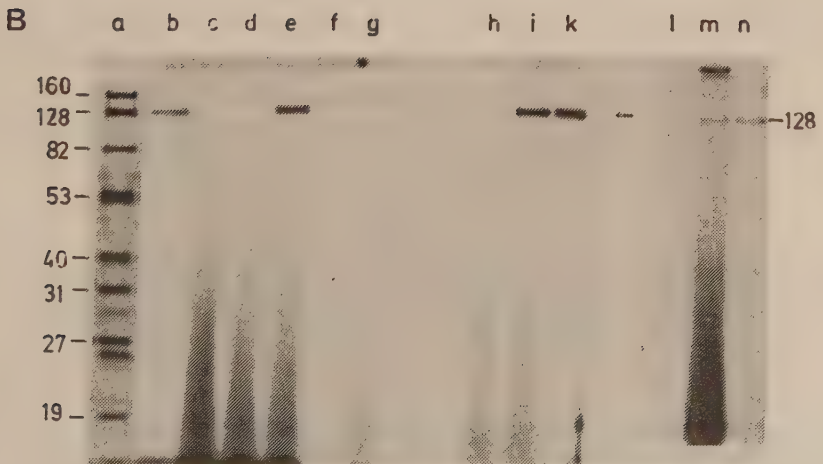
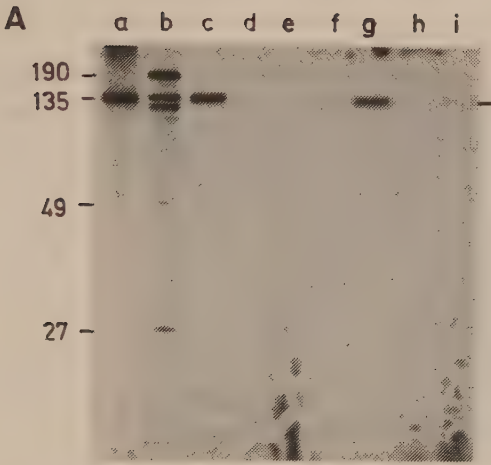
- a vollständiges Experiment mit 0,5 mM pHB-ATP
- b Proteinbanden; die Zahlen am Rand geben die Masse der Unter-einheiten in kD an
- c Exp. a + 8 µg/ml RNase A + 8 µg/ml DNase I, 15 min
- d wie c ohne Derivat
- e wie c mit 0,5 mM ATP anstelle von pHB-ATP
- f wie c ohne DNA
- g wie c mit 400 µg/ml α -Amanitin
- h wie c + 40 µg/ml Proteinase K, 20 min
- i wie c mit 0,5 mM ATP zusammen mit pHB-ATP

B RNA Polymerase III

- a Proteinbanden; die Zahlen am Rand geben M_r (10⁻³) der Unter-einheiten an
- b vollständiges Experiment mit 0,5 mM pHB-ATP
- c wie a ohne Derivat
- d wie a mit 0,5 mM ATP anstelle von pHB-ATP
- e wie a mit 0,5 mM ATP zusammen mit pHB-ATP
- f wie a ohne DNA
- g wie a ohne NaBH₄
- h wie a + 40 µg/ml Proteinase K, 20 min
- i wie a + 8 µg/ml RNase A, 20 min
- k wie a + 8 µg/ml DNase I, 20 min

l,m,n Das Enzym wurde mit 0,5 mM pHB-ATP wie in a modifiziert, in drei Gefäße aufgeteilt und poly[d(A-T)] als Matrize zugegeben; anstelle von [α -³²P]UTP wurden eingesetzt

- l [α -³²P]ATP
- m [α -³²P]ATP + 100 µM UTP
- n wie m + 8 µg/ml RNase A + 8 µg/ml DNase I, 20 min



2.4. *ANABAENA* RNA POLYMERASE

Die filamentöse *Anabaena* zählt zu den Cyanobakterien¹. Diese interessanten Prokaryoten sind zur Photosynthese befähigt und stellen vermutlich die Vorläufer der pflanzlichen Chloroplasten dar. Sie nehmen daher eine evolutionäre Schlüsselstellung ein. Vegetative *Anabaena*-Zellen können darüberhinaus in Heterocysten differenzieren, die N₂ fixieren. Die aus vegetativen Zellen isolierte RNA Polymerase (Schneider *et al.*, 1987) transkribiert von einer Reihe von vegetativen *Anabaena* Promotoren und auch effektiv von einem späten Bakteriophagen T4 Promotor (George Schneider, pers. Mitteilung; Elliot *et al.*, 1984), nicht aber die Gene für die N₂-Fixierung.

Dieses Enzym wurde mit Hilfe der Technik der Affinitätsmarkierung in Zusammenarbeit mit George Schneider (University of Chicago, Chicago) im Laboratorium von R. Haselkorn untersucht.

2 µg RNA Polymerase wurden mit 0,3 mM pHB-ATP in Gegenwart von einem klonierten Promotors (pTE55)² und mit 1 mM NaBH₄ modifiziert und darauf mit 0,16 µM [α -³²P]UTP (3000 Ci/mMol) umgesetzt (s. Methoden und Material). Nach der Auftrennung des Ansatzes über ein SDS-Polyacrylamidgel zeigt die Autoradiographie zwei radioaktive Banden, eine starke mit der Mobilität der β -Untereinheit und eine schwache, die mit dem σ -Faktor läuft (Fig. 19 a). Beide Signale

¹Cyanobakterien sind obligat photoautotrophe Prokaryoten, d.h. sie können (nur) lichtabhängig fixiertes CO₂ als C-Quelle benutzen. Darin liegt ihre Schlüsselposition bei der Entwicklung der Photosynthese begründet. Manche Arten, so auch *Anabaena*, haben darüberhinaus die Fähigkeit zur N₂-Fixierung und sind deshalb die unabhängigen Organismen. Die CO₂-Fixierung und die damit verbundene O₂-Produktion in den vegetativen Zellen wird in manchen Zellen innerhalb des Fadenverbandes, den Heterocysten, abgeschaltet, in denen dann die N₂-Fixierung abläuft. Die Metaboliten werden durch Poren zwischen den Zellen ausgetauscht (Schlegel, 1976; Schneider & Haselkorn, 1986)

²pTE55 enthält einen starken *E. coli* Promotor aus dem T4 Phagen-genom im Vektor pBR322, der von *Anabaena* RNA Polymerase stark transkribiert wird (Elliot *et al.*, 1984; G. Schneider, pers. Mitteilung). Der Zeitpunkt der Zugabe der Matriz - vor oder nach dem Reduktionsschritt - hat keinen Einfluß auf die Markierung.

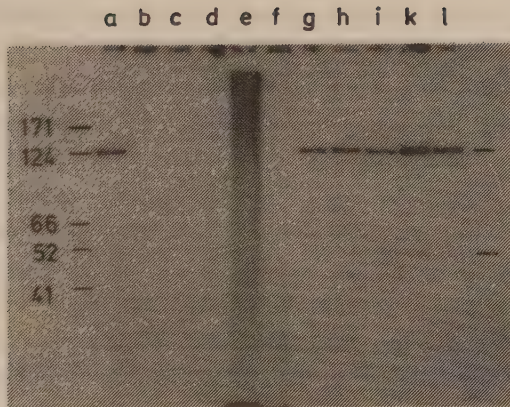


Fig. 19 Gelelektrophoretische Analyse der Affinitätsmarkierung der *Anabaena* RNA Polymerase

Die Elektrophorese erfolgte über ein 10% SDS-Polyacrylamidgel. Die Zahlen und die Pfeile geben die Positionen und die relativen Molmassen (10^{-3}) der jeweiligen Untereinheiten an³.

- a vollständiges Experiment mit 0,3 mM pHB-ATP
- b wie a ohne Derivat
- c wie a ohne DNA
- d wie a ohne NaBH₄
- e wie a mit 0,3 mM ATP anstelle von pHB-ATP
- f Exp. a + 40 µg/ml Proteinase K, 37°C, 15 min
- g Exp. a + 8 µg/ml RNase A, 37°C, 15 min
- h Exp. a + 4 µg/ml DNase I, 37°C, 15 min
- i vollständiges Experiment mit 0,3 mM oHB-ATP
- k vollständiges Experiment mit 0,3 mM AB-ADP
- l vollständiges Experiment mit 0,3 mM AB-AMP

³Die Polymerase aus vegetativen *Anabaena*-Zellen hat im wesentlichen die übliche Zusammensetzung prokaryotischer RNA Polymerasen $\beta\beta'\alpha_2$ mit σ -Untereinheit mit Mr 52k und einer zusätzlichen, stets mitgereinigten und immunpräzipitierbaren (sowohl durch anti- $\beta\beta'$ - als auch durch antigenisch damit nicht verwandte anti-p66-Seren) Core-Komponente p66 mit Mr 66k (Schneider & Haselkorn, 1986; Schneider *et al.*, 1987).

treten nicht auf, wenn das Derivat, die NaBH_4 -Reduktion oder die DNA-Matrize weggelassen werden oder das Derivat durch ATP ersetzt wird (Fig. 19 b-e). Nach einer RNase A- oder DNase I-Behandlung bleiben die Banden erhalten, während Proteinase K sie vollständig abbaut (Fig. 19 f-h).

Diese Kontrollen beweisen die spezifische und funktionelle Affinitätsmarkierung der zweitgrößten Untereinheit β und auch der σ -Untereinheit der *Anabaena* RNA Polymerase.

Die Verwendung von anderen Derivaten, oHB-ATP, AB-ADP oder AB-AMP führt ebenfalls zu einer Markierung von beiden Untereinheiten (Fig. 19 i,k,l).

Möglicherweise beruht die überraschende, zusätzliche Affinitätsmarkierung von σ , die hier erstmalig für eine prokaryotische RNA Polymerase bei der Verwendung von Aldehyd-Derivaten gefunden wurde, auf einer veränderten räumlichen Anordnung der *Anabaena* Polymerase-Untereinheiten gegenüber dem Enzym aus *E. coli* und anderen Prokaryoten oder auf einem zusätzlichen Lysinrest auf σ , der hier die Bindung erlaubt. Im Fall von *E. coli* wurde nicht mit Aldehyd-Derivaten, aber mit drei alkylierenden Affinitätsreagentien eine Markierung des σ -Faktors nachgewiesen (Grachev *et al.*, 1987a), was immerhin auf die prinzipielle Nähe dieser Untereinheit zum aktiven Zentrum hinweist.

Da über die Promotorerkennung der *Anabaena* RNA Polymerase noch zu wenig bekannt ist, kann die Bedeutung dieses Schritts bei der Markierung von σ nicht diskutiert werden.

Es ist unwahrscheinlich, aber durch diese Versuche nicht ausgeschlossen, daß es sich bei der mit σ komigrierenden Radioaktivität um ein unbekanntes Abbauprodukt von β handelt.

2.5. *E. COLI* Bakteriophagen RNA POLYMERASEN

Trotz vieler Unterschiede in Details hatten alle bisher untersuchten RNA Polymerasen eine vergleichbare Architektur, sie waren aus zwei Untereinheiten mit hohen relativen Molmassen von 120k bis 220k und einer Reihe kleinerer Untereinheiten zwischen 10k und 85k zusammengesetzt.

Enzyme, die die Gene von Bakteriophagen transkribieren, sind - sofern es sich nicht um die Wirtspolymerase selbst handelt - entsprechend ihrer speziellen Aufgaben und ihrer Herkunft völlig anders aufgebaut. Sie katalysieren aber als RNA Polymerasen zumindest die gleiche Reaktion, die matrixenabhängige Polymerisation von Nukleosidtriphosphaten durch die Bildung von 5',3'-Phosphodiesterbindungen. Es war deshalb interessant, ob solche Enzyme ebenfalls durch die auf dieser Reaktion beruhenden Technik markiert werden können, um so Informationen über deren katalytisches Zentrum und über die Methode selbst zu gewinnen.

2.5.1. Polymerasen des Coliphagen N4

Unter den doppelsträngigen DNA-Phagen einzigartig ist der Coliphage N4. Während die frühe Transkription der meisten anderen Phagen durch die RNA Polymerase des Wirts erfolgt, injiziert N4 zusammen mit seinem linearen 72 kbp-Genom eine eigene RNA Polymerase, die seine frühen Gene transkribiert. Darunter sind drei Gene, deren Expression zur Bildung einer weiteren, rein phagenkodierten RNA Polymerase führt, die für die Transkription der Gene im mittleren Stadium der Phagenentwicklung verantwortlich ist. Erst die späten Gene werden Wirtspolymerase-abhängig vom rechten Ende des Genoms her abgelesen, in entgegengesetzter Polarität zu den frühen und mittleren Transkripten, die vom linken Ende und der Mitte ausgehen (Zivin *et al.*, 1981; Rothman-Denes *et al.*, 1987; Kiino & Rothman-Denes, 1988).

2.5.1.1. N4 Virion RNA Polymerase

Die bei einer Infektion in die *E. coli* Zellen eingeschleuste RNA Polymerase wurde aus N4 Viruspartikeln gereinigt und zeigt ungewöhnliche Eigenschaften (Falco *et al.*, 1977, 1978, 1980). Sie besteht aus einer einzigen Peptidkette der hohen relativen Molmasse von 320k und transkribiert *in vitro* keinerlei native DNA, nur schwach heterologe denaturierte DNA, dagegen denaturierte N4 DNA mit *in vivo* Spezifität⁴. Die N4 Virion RNA Polymerase Promotoren besitzen eine ausgeprägte Sequenzhomologie von der Position -18 bis +1 und die gefundenen RNA-Spezies initiieren mit pppGpA (zweimal) und mit pppGpG (einmal) (Haynes & Rothman-Denes, 1985). Aufgrund dieser Spezifität wurde - in Zusammenarbeit mit Sandra Glucksmann (University of Chicago, Chicago) im Laboratorium von L. Rothman-Denes - N4 Virion RNA Polymerase (0,66 µg) mit 0,4 mM pHB-GTP und 1 mM NaBH₄ in Gegenwart von 2 µg denaturierter N4 DNA modifiziert und nach erneuter Zugabe von 2 µg denaturierter N4 DNA mit 0,065 µM [α -³²P]ATP (3000 Ci/mMol) als zweitem Substrat umgesetzt (s. Methoden und Material). Die Autoradiographie nach der Auftrennung dieses Ansatzes über ein SDS-Polyacrylamidgel zeigt eine radioaktive Bande mit der Mobilität der N4 Virion RNA Polymerase, die im gleichartigen Ansatz ohne Derivat fehlt (Fig. 20 f,g).

Wird die DNA nur einmal, zusammen mit dem Derivat, addiert, so ergibt sich ein gleich intensives Signal, während bei Zugabe erst nach der Modifizierung nur ein weit schwächeres auftritt. Die Intensität der radioaktiven Bande ist auch stark von der eingesetz-

⁴Zur Transkription *in vivo* ist bisher aus genetischen Untersuchungen bekannt, daß zwei Wirtsaktivitäten (*E. coli* Einzelstrang DNA-bindendes Protein (SSB) und DNA Gyrase) dazu absolut notwendig sind. Sogar *in vitro* werden *super-coiled* Promotoren von der Virion RNA Polymerase transkribiert, falls *E. coli* SSB zugegen ist (Rothman-Denes *et al.*, 1985; Kiino & Rothman-Denes, 1988).

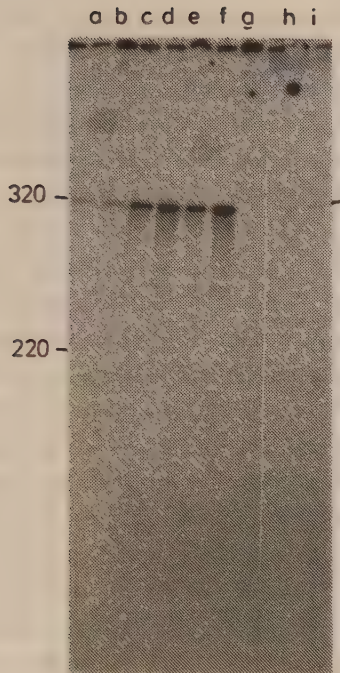


Fig. 20 Gelelektrophoretische Analyse der Affinitätsmarkierung der N4 Virion RNA Polymerase

Die Reaktionen erfolgten wie im Text beschrieben und wurden über ein 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Pfeile am Rand markieren die Position der Coomassie-gefärbten Proteinbande bzw. des angegebenen Markers (Myosin mit M_r 220 k).

- a vollständiges Experiment mit 0,4 mM pHB-GTP und einmaliger DNA-Zugabe nach der Modifizierung
- b vollständiges Experiment mit 0,03 mM pHB-GTP und DNA-Zugabe während der Modifizierung
- c wie b, aber mit 0,2 mM pHB-GTP
- d wie b, aber mit 0,4 mM pHB-GTP
- e vollständiges Experiment mit 0,2 mM pHB-GTP und zweimaliger DNA-Zugabe
- f wie e, aber mit 0,4 mM pHB-GTP
- g wie e ohne Derivat
- h vollständiges Experiment mit 0,2 mM pHB-GTP und Zugabe von Zugabe von 1 μ g Einzelstrang P1 Promotor in M13mp7 anstelle von denaturierter N4 DNA während der Modifizierung
- i wie h, aber mit 0,4 mM pHB-GTP

ten Derivatkonzentration abhängig; bei einer Verringerung auf 0,2 bzw. 0,03 mM pHB-GTP (gleichzeitig 0,5 bzw. 0,2 mM NaBH₄) findet man eine deutliche Abnahme (Fig. 20 a-f).

Darüberhinaus kann auch einzelsträngige DNA⁵ als Matrize verwendet werden. Es zeigt sich jedoch eine weitaus schwächere radioaktive Bande als in vergleichbaren Ansätzen mit denaturierter N4 DNA (Fig 2.5.1 h,i vs. c,d).

Diese Versuche demonstrieren, daß eine eindeutig von dem Derivat und der Art und dem Zeitpunkt der DNA-Zugabe abhängige Affinitätsmarkierung der N4 Virion RNA Polymerase auftritt. Damit kann das völlig anders als die pro- und eukaryotischen Polymerasen aufgebaute, aus einem einzigen Polypeptid bestehende Enzym ebenfalls mit dieser Technik untersucht werden. Trotz der offensichtlichen Unterschiede sollten zumindest gemeinsame Strukturelemente vorhanden sein.

Eine interessante Beobachtung ist die weit intensivere Markierung der Polymerase in diesem Fall, wenn die DNA bereits während der Modifizierung anwesend ist. Untersuchungen zur Enzymaktivität zeigten, daß die N4 Virion RNA Polymerase stark durch NaBH₄ allein oder zusammen mit dem Derivat (bis zu 75% durch 1 mM NaBH₄), nicht aber durch eine Inkubation mit dem Derivat allein (0,3 mM pHB-GTP) inhibiert wird, falls in dieser Zeit keine DNA-Matrize vorhanden ist. Diese ausgeprägte Sensitivität gegenüber NaBH₄ findet man dagegen nicht, wenn bereits bei der Modifizierung DNA zugegen war (ohne Belege). Somit übt die DNA einen Schutzeffekt gegen eine Inaktivierung der Polymerase durch die NaBH₄-Behandlung aus, wodurch sich die Verstärkung der Markierung erklären könnte. Alternativ besteht die Möglichkeit, daß die N4 Virion RNA Polymerase die DNA-Matrize zur effizienteren Substratbindung, also auch zur Bindung des Derivats benötigt (vgl. aber auch Kap. 2.5.2.2.).

⁵122 bp *Rsa*I-Fragment mit N4 Promotor Pl (Rothman-Denes *et al.*, 1987) in *Hinc*II-Stelle von M13mp7 (S. Glucksmann, pers.Mitteilung).

2.5.1.2. N4 RNA Polymerase II

Die Transkription der Gene des mittleren Stadiums der Phagenentwicklung ist abhängig von drei Produkten der frühen Gene, die von N4 Virion RNA Polymerase abgelesen werden: p4 (M_r 40k), p7 (30k) und p17 (15k) (Rothman-Denes & Schito, 1974; Falco & Rothman-Denes, 1979; Zehring *et al.*, 1983).

Die Anreicherung von p4p7-Heterodimeren aus infizierten *E. coli*-Zellen (Zehring & Rothman-Denes, 1983; Zehring *et al.*, 1983) zeigte, daß diese Polypeptide wiederum eine ungewöhnliche RNA Polymerase konstituieren, die zwar *in vitro* keine native DNA, aber bevorzugt, wenn auch unspezifisch, denaturierte N4 DNA abliest. p17 vermittelt vermutlich die Fähigkeit zum Ablesen doppelsträngiger DNA und eine Spezifität bei der Transkription (Klara Abrevaya & Lucia Rothman-Denes, pers. Mitteilung; Kiino & Rothman-Denes, 1988). Bisher konnten sieben *in vivo*-Startstellen dieser N4 RNA Polymerase Aktivität identifiziert werden. Sie besitzen je zwei homologe Sequenzabschnitte im Bereich von -33 bis +1. Die Transkripte initiieren in diesen Fällen stets mit ATP, das zweite Nukleotid ist AMP, CMP oder UMP (Rothman-Denes *et al.*, 1987). Um eine Affinitätsmarkierung dieses Enzyms zu erzielen, wurde deshalb in Zusammenarbeit mit Klara Abrevaya im Laboratorium von L. Rothman-Denes (University of Chicago, Chicago) eine p4p7-Präparation (Zehring & Rothman-Denes, 1983) mit 0,4 mM pHB-ATP und 0,5 mM NaBH_4 in Gegenwart von denaturierter N4 DNA modifiziert und anschließend mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ inkubiert.

Die Autoradiographie nach einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigt neben einer Reihe anderer Banden eine mit der Mobilität von p7, die nach einer Verdauung mit Proteinase K verschwindet, aber resistent gegenüber RNase A und DNase I ist (Fig. 21 b,c,g,h,i). Darüberhinaus fehlt diese radioaktive Bande, falls das Derivat, die DNA oder der Reduktionsschritt weggelassen werden oder das Adenosin-Derivat durch ATP ersetzt wird (Fig. 21 d,e,f,k). Die zweimalige Zugabe von DNA - während und nach der Modifizierung - bewirkt eine Erhöhung des Signals, was aber möglicherweise lediglich auf der dadurch bewirkten Konzentrations-

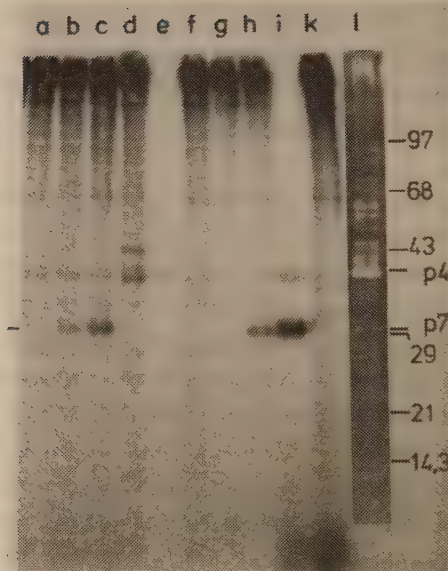


Fig. 21 Gelelektrophoretische Analyse der Affinitätsmarkierung der N4 RNA Polymerase II Aktivität

Eine p4p7-Präparation (5 µg) wurde in Gegenwart von 2,6 µg hitze-denaturierter N4 DNA mit 0,4 mM pHB-ATP inkubiert und mit 0,5 mM NaBH₄ reduziert. Danach wurde mit 0,075 µM [α -³²P]UTP (3000 Ci/mMol) umgesetzt.

Die Ansätze wurden über ein 15% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Pfeile kennzeichnen die Positionen von p4 (40k), p7 (30k) und der Proteinmarker (Rinderserumalbumin mit Mr 68k, Ovalbumin 43k, Carboanhydratase 29k, Soja-Trypsininhibitor 21k).

- a vollständiges Experiment mit 0,1 mM pHB-ATP
- b vollständiges Experiment mit 0,4 mM pHB-ATP
- c vollständiges Experiment mit 0,4 mM pHB-ATP, aber nochmalige Zugabe von denaturierter N4 DNA nach der Reduktion
- d wie b ohne Derivat
- e wie b ohne DNA
- f wie b ohne NaBH₄
- g Exp. c + 1 µg Proteinase K, 37°C, 12 min
- h Exp. c + 0,2 µg RNase A, 37°C, 12 min
- i Exp. c + 0,1 µg DNase I, 37°C, 12 min
- k wie b, aber mit 0,4 mM ATP anstelle von pHB-ATP
- l Färbung der Proteinbanden mit Silber (Merril *et al.*, 1981)

erhöhung der DNA beruht (Fig. 21 b,c). Setzt man weniger Derivat (0,1 statt 0,4 mM) ein, so ist die Intensität der p7-Bande stark geschwächt, wogegen alle anderen, unspezifischen Banden unverändert bleiben (Fig. 21 a).

Alle diese Kontrollen zeigen eine funktionelle Affinitäts-markierung des 30k-Polypeptids p7 der N4 RNA Polymerase II. p7 muß demnach in der Lage sein, das Adenosin-Derivat so zu binden, daß es korrekt als Startnukleotid verwendet werden kann. Gleichzeitig demonstriert dieser Befund die Anwendung der Technik auch auf dieses wiederum völlig anders aufgebaute Enzym, das mit seinen beiden 30k und 40k Untereinheiten die kleinste, bekannte RNA Polymerase darstellt.

2.5.2. T7 und T3 RNA Polymerasen

Die RNA Polymerasen der ungeraden, doppelsträngigen DNA Coliphagen T3 und T7 gehören neben dem Enzym aus *E. coli* zu den am besten charakterisierten DNA-abhängigen RNA Polymerasen (Chamberlin & Ryan, 1982). Sie werden nach der Infektion durch die Wirtspolymerase abgelesen und bestehen aus einer einzigen Polypeptidkette von 884 bzw. 883 Aminosäuren. Das ergibt eine relative Molmasse von etwa 98k. Ihre Gene sind sequenziert und expressionskloniert (Stahl & Zinn, 1981; Dunn & Studier, 1983; Davanloo *et al.*, 1984; Tabor & Richardson, 1985; McGraw *et al.*, 1985). Ohne zusätzliche Proteinfaktoren transkribieren sie nur ihre homologen Promotoren mit einer außerordentlich hohen Spezifität⁶, obgleich sowohl die Polymerasen - 82% der Aminosäuren sind identisch - als auch die beiden Promotoren - die jeweils 23 bp langen Konsensus-Sequenzen sind beinahe identisch - strukturell verwandt sind (Morris *et*

⁶ *In vitro* wird diese Eigenschaft zur Synthese von spezifischen RNA-Proben benutzt (Tabor & Richardson, 1985), *in vivo* werden die Gene der späten Phase der Phagenentwicklung abgelesen (Chamberlin & Ryan, 1982).

al., 1986, 1987). Auf DNA-Ebene ergaben Mutationsstudien, daß lediglich die Transversion eines G-C-Basenpaares an Position -11 der T7 Promotor-Sequenz in ein C-G genügt, um die Spezifität der beiden Polymerasen zu wechseln (Bailey *et al.*, 1983; Morris *et al.*, 1987). *In vitro* Konstruktionen von hybriden T3/T7-Enzymen zeigten *in vitro* und *in vivo*, daß die Determinanten für die homologe Promotorerkennung im Carboxy-terminalen Drittel der Polypeptide liegen (Morris *et al.*, 1987).

Diese Enzyme scheinen demnach ein ideales System für die Untersuchung von Struktur-Funktionsbeziehungen an RNA Polymerasen zu bilden. Die Technik der funktionellen Affinitätsmarkierung könnte dabei mithelfen, Informationen über die Bindung des initiiierenden Nukleotids und das katalytische Zentrum zu gewinnen.

2.5.2.1. Affinitätsmarkierung der T7 und T3 RNA Polymerasen

Da die Mehrzahl der T7-Promotoren die RNA-Synthese mit pppGpG beginnen, wurde T7 RNA Polymerase (0,5 µg) zuerst mit 0,4 mM pHB-GTP und 1,0 mM NaBH₄ in Gegenwart von 1,5 µg T7 DNA⁷ modifiziert und anschließend mit 0,4 µM [α -³²P]GTP (600 Ci/mMol; ICN Radiochemicals, Irvine, CA, USA) inkubiert. Die Autoradiographie nach einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigt eine mit der Polymerase Bande wandernde Radioaktivität, die durch Proteinase K abgebaut wird, nicht jedoch durch DNase I oder RNase A und RNase T1 (Fig. 22 a,f,g,h,p)⁸.

⁷Der Zeitpunkt der DNA-Zugabe zu Beginn der Reaktionsfolge oder nach einer erfolgten Modifizierung hatte keinen signifikanten Einfluß auf das Signal (ohne Belege; s. Kap. 2.5.2.2).

⁸In diesem Fall wurde auch die G-spezifische RNase T1 verwendet, um den unwahrscheinlichen Fall auszuschließen, daß es sich bei dem Signal um ein zufällig mit dem Protein komigrierendes poly(rG) handelt.

Die damit gezeigte radioaktive Markierung der T7 Polymerase ist matrizenabhängig und beruht auf der Reaktion und irreversiblen Fixierung des Derivats. Sie unterbleibt in einem Ansatz ohne Derivat, ohne die Reduktion oder ohne DNA oder beim Ersatz des Guanosin-Derivates durch GTP (Fig. 22 b,c,d,e).

Die Markierung ist weitaus schwächer, wenn nur 0,05 bzw. 0,1 mM anstelle von 0,4 mM Derivat eingesetzt werden (ohne Belege). Die Zugabe einer äquimolaren Menge an GTP zusammen mit dem Derivat verhindert erwartungsgemäß die Markierung, da auf jeden Fall eine starke Erniedrigung der spezifischen Radioaktivität des $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ im letzten Schritt eintritt.

Somit ist gezeigt, daß auch für die nur aus einer Polypeptidkette bestehenden T7 RNA Polymerase mit dieser Technik eine funktionelle Affinitätsmarkierung erreicht werden kann. Da die Aminosäuresequenz des Enzyms bekannt ist, soll die Affinitätsmarkierung besonders in diesem gut charakterisierten System ausgenutzt werden, um durch spezifische Spaltungen der Peptidkette die Region(en) zu lokalisieren und analysieren, an der (denen) das Startnukleotid gebunden wurde. Erste Versuche von Ellen Jorgensen und William McAllister finden die Markierung ausschließlich im C-terminalen, ca. 80k-Teil des Enzyms (Schäffner *et al.*, 1987). Dies steht im Einklang mit Beobachtungen von Ikeda & Richardson (1987), daß ein C-terminales 75k-Fragment der T7 Polymerase noch wichtige Funktionen einschließlich der Initiation ausführen kann.

Zur Affinitätsmarkierung können auch andere Guanosin-Derivate - AB-GDP, AB-GMP und oHB-GTP (Fig. 22 k,l,m) - und auch Adenosin-Derivate - pHB-ATP und AB-ADP (Fig. 22 n,o) mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ als zweitem Substrat eingesetzt werden. Die Affinitätsmarkierung mit alkylierenden und Imin-bildenden (u.a. pHB-ATP) Adenosin-Derivaten wurde kürzlich auch von Grachev *et al.* (1987c) berichtet. Dies reflektiert möglicherweise eine Initiation an einen kleinen Teil der schwächeren Promotoren, die die RNA-Synthese mit pppApG beginnen können (Dunn & Studier, 1983).

Da die T3 RNA Polymerase trotz der entscheidenden Unterschiede einen äußerst hohen Verwandtschaftsgrad zum Enzym aus T7 besitzt, sollte man auch die Möglichkeit einer Affinitätsmarkierung der T3 Polymerase mit dieser Technik erwarten.

Da die T3 Konsensussequenz wie im Fall von T7 zu einem pppGpG-Start der RNA führt (Bailey *et al.*, 1983; Morris *et al.*, 1987), wurden 0,5 µg T3 RNA Polymerase mit 0,4 mM pHB-GTP und 0,5 mM NaBH₄ in Gegenwart von 2,3 µg T3 DNA modifiziert und anschließend mit 0,3 µM [α -³²P]GTP (1000 Ci/mMol) umgesetzt (s. Material und Methoden). Nach der Auftrennung der Ansätze über ein SDS-Polyacrylamidgel zeigt die Autoradiographie eine mit der Polymerase wandernde Radioaktivität, die durch Proteinase K abgebaut wird. Die Markierung unterbleibt, wenn das Derivat, der Reduktionsschritt oder die DNA weggelassen werden, oder wenn das Guanosin-Derivat durch GTP ersetzt wird (Fig. 22 q,r,s,t,u,v). Damit ist die vermutete funktionelle Affinitätsmarkierung der T3 RNA Polymerase experimentell bestätigt.

2.5.2.2. Promotorabhängigkeit der Affinitätsmarkierung der T7 RNA Polymerase

Die T7 RNA Polymerase zeigt an starken, homologen Promotoren eine ausgeprägte Startspezifität. Alle diese Klasse III⁹-Promotoren weisen eine identische 23 bp lange Sequenz von Position -17 bis +6 auf und initiieren die RNA-Synthese mit pppGpG(pG...). Das gleiche gilt für die Mehrzahl der schwächeren, Klasse II-Promotoren, die sich an zwei bis sieben Nukleotidpositionen von der Konsensussequenz der Klasse III Promotoren unterscheiden. Einer der Klasse

⁹Auf dem Genom von T7 existieren drei Klassen von Promotoren, die sowohl räumlich als auch zeitlich aufeinander folgen. Klasse I Promotoren werden im frühen Stadium vom linken Ende des Genoms aus von *E. coli* RNA Polymerase abgelesen (u.a. Gen für T7 RNA Polymerase). Anschließend transkribiert die T7 Polymerase von schwächeren, homologen Promotoren (Klasse II) und darauf wiederum von starken, Klasse III Promotoren in der späten Phase der Infektion (Dunn & Studier, 1983).

II-Promotoren, der Promotor $\Phi 2.5$ besitzt an Position +1 ein A-T-Basenpaar mit dem daraus abgeleiteten RNA-Start pppApG(pG...) (Dunn & Studier, 1983; Fig. 23).

Verwendet man derartige Promotoren als DNA-Matrize, so könnte man an diesem System erstmals untersuchen, ob die Affinitätsmarkierung eine Promotor-gesteuerte Spezifität der Initiation widerspiegelt oder ob diese durch die Modifizierung des Enzyms verloren geht. Die Experimente dazu wurden mit in Plasmiden klonierten, individuellen Promotoren als DNA-Matrizen - pAR436 enthält den $\Phi 10$, pAR219 den $\Phi 2.5$ und cg2RR329 keinen Phagenpromotor (Studier & Rosenberg, 1981; s. Material) - und verschiedenen Kombinationen von Adenosin- oder Guanosin-Derivaten mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ oder $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ durchgeführt.

In Gegenwart des starken Klasse III-Promotors $\Phi 10$ (pAR436) findet man eine intensive Affinitätsmarkierung nur dann, wenn das Enzym mit pHB-GTP modifiziert wurde und man als zweites Substrat $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ einsetzte. Dagegen wird mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ als radioaktivem Nukleotid oder für die Kombination pHB-ATP/ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ ein weitaus schwächeres Signal und im Fall von pHB-ATP/ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ oder pHB-GTP/ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ keinerlei Markierung gefunden (Fig. 23 f-k).

Ersetzt man $\Phi 10$ durch ein Plasmid ohne Phagenpromotor (cg2RR329), so findet man mit pHB-GTP/ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ oder mit pHB-ATP/ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ ebenfalls keine radioaktive Bande (Fig. 23 l,m).

Wird dagegen in Gegenwart des schwachen Klasse II-Promotors $\Phi 2.5$ gearbeitet, ergibt sowohl pHB-ATP als auch pHB-GTP als Derivat in Kombination mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ eine etwa gleich starke Markierung der Polymerase. Mit pHB-GTP/ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ erhält man noch ein schwaches und mit pHB-ATP/ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}^{10}$ oder $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ kein radioaktives Signal (Fig. 23 a-e).

Für $\Phi 2.5$ wurde beobachtet, daß nur etwa die Hälfte der RNA-Ketten mit ATP initiieren und damit an Position +1 starten (Fig. 23),

¹⁰Die Markierung der T7 Polymerase am $\Phi 2.5$ Promotor mit pHB-ATP/ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ bietet deshalb die Möglichkeit, die im Fall der Weizenkeim RNA Polymerase II nicht eindeutig klärbare Frage nach einer Kompetition des Nukleotidderivats mit ATP allein in ersten Schritt untersuchen.

während der Rest mit GTP beginnt (Dunn & Studier, 1983; W.T. McAllister & J.J. Dunn, pers. Mitteilung). Diese offensichtliche Ungenauigkeit bei der Initiation ist möglicherweise typisch für die schwachen Klasse II-Promotoren und könnte auch die geringe Markierung mit $\text{pHB-GTP}/[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ erklären (Start bei Position +4).

Damit konnte gezeigt werden, daß eine effiziente Affinitätsmarkierung der T7 RNA Polymerase sowohl am starken $\Phi 10$ als auch am schwachen $\Phi 2.5$ Promotor nur für solche Kombinationen an Nukleotidderivat und Substrat beobachtet wird, die konsistent mit den bekannten Initiationssequenzen dieser Promotoren sind. Falls die DNA keinen T7 Promotor enthält, kommt es zu keiner Markierung.

Die Affinitätsmarkierung der T7 RNA Polymerase ist also nicht nur funktionell, sondern auch Promotor-abhängig und spezifisch Promotor-gesteuert. Die kovalente Modifizierung zerstört also nicht die ansonsten beobachtete Spezifität des Enzyms.

Äußerst interessant ist auch eine analoge Versuchsreihe, wobei $\Phi 10$ (pAR436) im Gegensatz zu den obigen Experimenten erst nach der Modifizierung der Polymerase zugegeben wurde. Man erhält wiederum das gleiche Ergebnis (Fig. 23 n-t). Aus dieser Beobachtung lassen sich mehrere Schlüsse ziehen.

Einmal ist für die Bindung des Startnukleotids an die T7 RNA Polymerase keine DNA-Matrize nötig; das gleiche gilt auch für alle anderen untersuchten Enzyme.

Zum anderen wird ungeachtet der erfolgten kovalenten Bindung eines bestimmten Startnukleotids dieses an dem erst danach zugesetzten Promotor nur durch solche Substrate verlängert, die der Initiationssequenz entsprechen. Für die beobachtete Spezifität ist also in erster Linie nicht die Bindung des Startnukleotids entscheidend, sondern die nachfolgende Polymerisationsreaktion, die nur erfolgt, wenn das durch die DNA-Initiationssequenz kodierte Nukleotidpaar im katalytischen Zentrum vorhanden ist.

Ein äußerst interessanter Aspekt, der auch für alle anderen untersuchten Enzyme zutraf (einschließlich der hier nicht beschriebenen Markierung der *E. coli* RNA Polymerase, ohne Beleg), ist die Tatsache, daß zur korrekten Bindung des Startnukleotids keine Matrize notwendig ist. Andernfalls wäre eine Affinitätsmarkierung nicht möglich, wenn die DNA erst nach der Fixierung des Nukleotidderivats zugegeben wird.

Die hier erstmals gezeigte, eindeutig Promotor-gesteuerte Affinitätsmarkierung - Grachev *et al.* (1987a) verwendeten im Fall der *E. coli* RNA Polymerase zwar zu Initiationssequenzen komplementäre Nukleotidkombinationen, sie führten aber keine geeigneten Kontrollexperimente durch - belegt auch, daß es sich dabei tatsächlich um die direkte Erfassung einer Initiationsreaktion handelt. Die ansonsten in dieser Arbeit gefundenen Affinitätsmarkierungen könnte man, ohne die Aussagen hinsichtlich des aktiven Zentrums einzuschränken, auch als Elongationsreaktion ansehen, wobei das gebundene Nukleotidderivat einen (RNA-)primer mimen würde.

Fig. 22 Gelelektrophoretische Analyse der Affinitätsmarkierung der T7 und T3 RNA Polymerasen

Die Markierungsansätze wurden wie im Text beschrieben mit 0,5 µg Polymerase durchgeführt und auf drei 10% SDS-Polyacrylamidgelen (a-o, p-q und r-w) aufgetrennt. Die Pfeile markieren die Positionen der mit Coomassie gefärbten Polymerasen. Die Bahnen a - q zeigen Experimente mit T7 RNA Polymerase, r - w mit T3 RNA Polymerase. In a-o wurde T7 DNA, in r-w T3 DNA als Matrize eingesetzt.

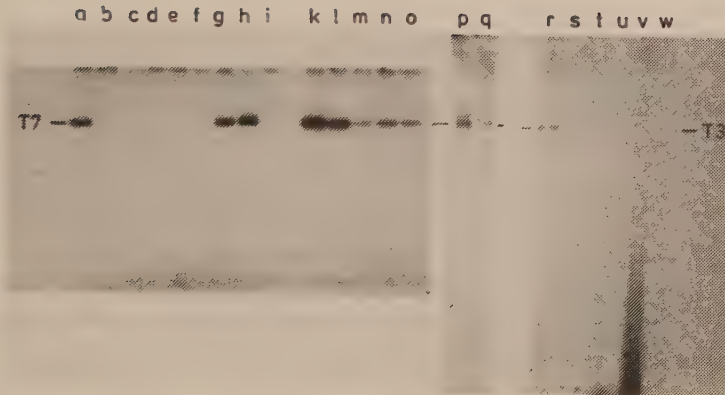
a,r	vollständige Experimente mit 0,4 mM pHB-GTP
b,s	wie a,r ohne Derivat
c,t	wie a,r ohne DNA
d,u	wie a,r ohne NaBH ₄
e,v	wie a,r mit 0,4 mM GTP anstelle von pHB-GTP
f,w	Exp. a,r + 50 µg/ml Proteinase K, 37°C, 12 min
g	Exp. a + 15 µg/ml RNase A, 37°C, 12 min
h	Exp. a + 50 U/ml DNase I, 37°C, 12 min
i	wie a, aber mit 0,4 mM GTP zusammen mit Derivat
k-o	vollständige Experimente mit 0,4 mM
k	AB-GDP l AB-GMP
m	oHB-GTP n pHB-ATP
o	AB-ADP
p	wie a mit 1,5 µg pAR436 als Matrize anstelle von T7 DNA
q	Exp. p + 50 U/ml RNase T1, 37°C, 12 min

Fig. 23 Promotor-gesteuerte Spezifität der Affinitätsmarkierung

0,5 µg T7 RNA Polymerase wurden wie über den Bahnen angegeben mit 0,4 mM pHB-GTP oder pHB-ATP und 0,5 mM NaBH₄ in Gegenwart von 1,5 µg pAR 219 (Promotor Φ2.5; Bahnen a-e), pAR436 (Promotor Φ10; f-k) oder cg2RR329 (ohne Phagenpromotor; l,m) modifiziert. Darauf wurden die Enzyme mit 0,2 µM [α -³²P]GTP, [α -³²P]ATP oder [α -³²P]UTP (1200 Ci/mMol) inkubiert (s. Methoden und Material). Die Bahnen n-t sind analog zu den Bahnen f-m, jedoch wurde hier die Polymerase in Abwesenheit von DNA mit pHB-GTP oder pHB-ATP modifiziert. Ein jeweils 0,5 µg modifizierte RNA Polymerase enthaltendes Aliquot wurde daraufhin mit 1,5 µg pAR436 (Φ10) und wie angegeben mit [α -³²P]NTP weiter inkubiert. Die Sequenzen der verwendeten Phagenpromotoren lauten

	+1	
Φ10	TAATACGACTCACTATAGGGAGA	(pAR436) = Konsensussequenz
Φ2.5	TAATACGACTCACTATTAGGGAA	(pAR219)

Die Position +1 des RNA-Starts ist angegeben und fettgedruckt, Abweichungen von der Konsensussequenz sind unterstrichen. Die Ansätze wurden über zwei 10% SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt (a-m und n-t); die Position der mit Coomassie gefärbten Polymerase ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.



	a	b	c	d	e	f	g	h	i	k	l	m	n	o	p	q	r	s	t
Derivat	A	G	A	G	A	A	G	A	G	G	A	G	A	G	A	G	G	A	G
(α - 32 P)NTP	C	G	A	A	U	G	G	A	A	U	G	G	G	G	A	A	U	G	G



3. BINDUNG DES 5'-ENDES VON RNA AN WEIZENKEIM RNA POLYMERASE

Bei der Affinitätsmarkierung mit Aldehyd-Nukleotidderivaten bewirkt die Reduktion zugleich eine irreversible Fixierung des Startnukleotids an die Polymerase und eine Inaktivierung der überschüssigen Derivatmoleküle¹. Somit können nach diesem Schritt weder Umlagerungen der gebundenen Nukleotidderivate erfolgen noch zusätzliche Derivate neu gebunden werden.

Darin liegt ein entscheidender Vorteil dieser Methode, da die Bindung des Startnukleotids eindeutig von der nachfolgenden Polymerisationsreaktion getrennt wird, und so nur bereits gebundene Nukleotide, die korrekt ins aktive Zentrum reichen, von dem danach zugesetzten radioaktiven Nukleosidtriphosphat durch die Katalyse des Enzyms verlängert und dadurch nachgewiesen werden können. Kehrt man ungeachtet dessen die Reaktionsfolge derart um, daß zuerst eine Polymerisation erfolgen kann und danach die gebildeten Produkte durch den Reduktionsschritt kovalent fixiert werden, so entspricht das im wesentlichen einem Ansatz, den Sverdlov *et al.* (1978), Sverdlov und Tsarev (1980), Grachev und Zaychikov (1981) und detaillierter Hanna & Meares (1983b) mit 5'-Azido-Nukleotidderivaten als Photoaffinitätsreagentien und *E. coli* RNA Polymerase verfolgten. Über die Azidogruppe am 5'-Ende der entstandenen RNA-Ketten wurden diese durch UV-Bestrahlung kovalent an Enzymuntereinheiten und/oder die DNA-Matrize gebunden. Diese Methode hat aber offensichtlich eine andere Zielsetzung wie die funktionelle Affinitätsmarkierung, da nicht die Lokalisierung des Startnukleotids Gegenstand der Untersuchung ist, sondern die Bindung des 5'-Endes naszierender RNA an das Enzym, um dadurch Informationen über deren Weg aus dem katalytischen Komplex zu gewinnen.

¹Die Aldehydgruppe wird zum Alkohol reduziert.

3.1. SPEZIFISCHE MARKIERUNG DER BEIDEN GRÖSSTEN POLYMERASE- UNTEREINHEITEN

Unter diesem Gesichtspunkt war es interessant herauszufinden, ob und welche Untereinheiten der eukaryotischen RNA Polymerase II aus Weizenkeimen bei einem analogen Vorgehen mit einem Aldehyd-Derivat markiert würden.

Nach einer 10minütigen Vorinkubation von 2,5 µg Weizenkeim RNA Polymerase II mit 0,5 mM pHB-ATP wurden 0,8 µg Plasmid-DNA (cg2RR329), je 50 µM ATP, CTP und GTP und 0,064 µM [α - 32 P]UTP zugesetzt. Die Addition der übrigen Nukleosidtriphosphate sollte die Synthese längerer RNA-Ketten erlauben. Nach weiteren 15 min wurde der Ansatz abgekühlt und bei 0°C mit 2 mM NaBH₄ reduziert. Die Autoradiographie nach der Auftrennung über ein SDS-Polyacrylamidgel zeigt drei radioaktive Banden mit einer jeweils etwas geringeren Mobilität als die Proteinfärbung der beiden Formen der größten Polymerase-Untereinheit mit Mr 220k und 180k (s. Kap. 2.1.1.) und der zweitgrößten Untereinheit mit 140k (W220, W180 und W140). Zusätzlich tritt im Bereich unterhalb von etwa 30k Radioaktivität auf, die jedoch durch eine RNase A-Nachbehandlung vollständig abbaubar ist (ohne Beleg; vgl. Fig. 6). Bei den drei hochmolekularen Banden bewirkt RNase A dagegen höchstens eine Verringerung der Intensität, auffallend aber ist vorallem die Erhöhung der Mobilität, so daß die radioaktiven Signale wieder mit der Proteinfärbung zusammenfallen. Eine DNase I-Verdauung hat keinerlei Einfluß auf die Radioaktivität, wogegen sie durch Proteinase K völlig abgebaut wird (Fig. 24 a-e).

Die Versuche ohne Derivat, ohne die Reduktion oder ohne DNA ergeben keine radioaktiven Banden. Steigende Konzentrationen von α -Amanitin (0,5, 1, 2, 5 µg/ml) bewirken eine deutliche Abnahme der Intensität aller drei Banden (Fig. 24 f-n).

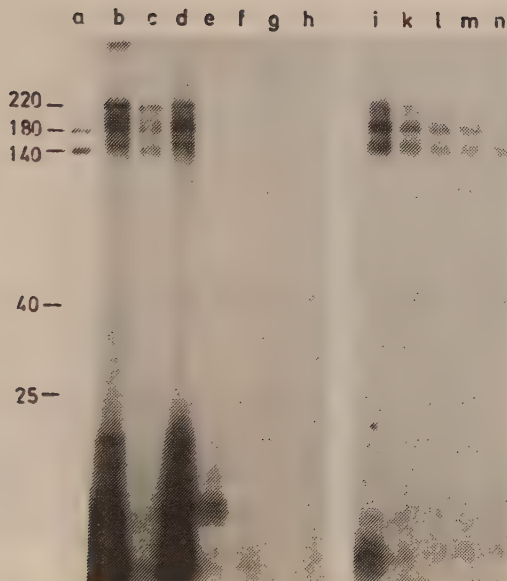


Fig. 24 Gelelektrophoretische Analyse der Markierung von W220, W180 und W140 bei Reduktion nach der RNA Synthese

Die Umsetzung von jeweils 2,5 μ g RNA Polymerase erfolgte wie im Text beschrieben mit umgekehrter Reihenfolge der beiden letzten Reaktionsschritte der üblichen Affinitätsmarkierung, so daß vor der stabilen Fixierung des Nukleotidderivats durch die Reduktion eine Polymerisationsreaktion stattfinden konnte. Die Ansätze wurden über zwei 6 - 18% SDS-Polyacrylamidgele (a-h, i-n) aufgetrennt.

- a Proteinbanden mit Coomassie gefärbt. Die Zahlen geben die relativen Molmassen (10^{-3}) der beiden größten Polymerase-Untereinheiten an (220k bzw. 180k und 140k).
 - b vollständiges Experiment mit 0,5 mM pHB-ATP
 - c Exp. b + 7 μ g/ml RNase A, 37°C, 12 min
 - d Exp. b + 3,3 μ g/ml DNase I, 37°C, 12 min
 - e Exp. b + 7 μ g/ml RNase A + 3,3 μ g/ml DNase I, 37°C, 12 min + 30 μ g/ml Proteinase K, 37°C, 15 min
- Alle weiteren Ansätze (f-n) wurden mit 7 μ g/ml RNase A und 3,3 μ g/ml DNase I, 37°C, 12 min nachbehandelt.
- f wie b ohne Derivat
 - g wie b ohne DNA
 - h wie b ohne NaBH₄
 - i vollständiges Experiment mit 0,5 mM pHB-ATP
 - k wie i + 0,5 μ g/ml α -Amanitin
 - l wie i + 1 μ g/ml α -Amanitin
 - m wie i + 2 μ g/ml α -Amanitin
 - n wie i + 5 μ g/ml α -Amanitin

Diese Kontrollexperimente zeigen, daß die Radioaktivität an die beiden größten Polymerase-Untereinheiten W220, bzw. dessen Abbauprodukt W180 (Link *et al.*, 1978; Guilfoyle *et al.*, 1984) und W140² gebunden wurde und daß diese Markierungen spezifisch sind, indem sie sowohl von der Umsetzung mit dem Derivat als auch von der enzymatischen Aktivität abhängig sind.

3.2 HETEROGENE RNA-KETTEN AN W220 UND W140

Die Strategie des Ansatzes legt durch seine prinzipielle Analogie zu den Arbeiten mit 5'-Photoaffinitäts-Nukleotidderivaten und den Zusatz von Nukleosidtriphosphaten die Vermutung nahe, daß es sich bei der Markierung um über das 5'-Ende gebundene, möglicherweise längere RNA-Ketten handelt.

Diese könnten einmal die leichte Retardierung der radioaktiven Banden gegenüber den gefärbten Proteinbanden² erklären und gleichzeitig die Erhöhung der Mobilität durch die RNase A-Verdauung, wenn man dadurch einen teilweisen Abbau der gebundenen RNA annimmt.

Um diese Vermutungen zu klären, wurden die markierten Untereinheiten in präparativen Experimenten ohne (W220, W140) und mit RNase A-Nachbehandlung vor der Denaturierung (W220R, W140R) einzeln aus einem SDS-Polyacrylamidgel eluiert (s. Methoden; Fig. 25 A a-e)³.

²Die Diskrepanz zwischen Radioaktivität und Proteinfärbung ist dadurch erklärbar, daß der Anteil an markierten Polymerase-Molekülen im Bereich von 1 bis 3% liegen dürfte (vgl. Kap. 2.1.5.1). Die gewisse Unschärfe der radioaktiven Banden könnte durch angeheftete heterogene RNA hervorgerufen werden (Kap. 3.2.).

³Es wurde eine Polymerase-Präparation verwendet, deren größte Untereinheit überwiegend als W220 vorlag. Der Versuch ohne RNase A-Behandlung wurde auch mit einer Polymerase-Anreicherung durchgeführt, deren größte Untereinheit zu einem beträchtlichen Teil in W180 gespalten war (Link *et al.*, 1978; Guilfoyle *et al.*, 1984). Die Untersuchungen auch von W180 ergaben die gleichen Ergebnisse wie für W220 und W140.

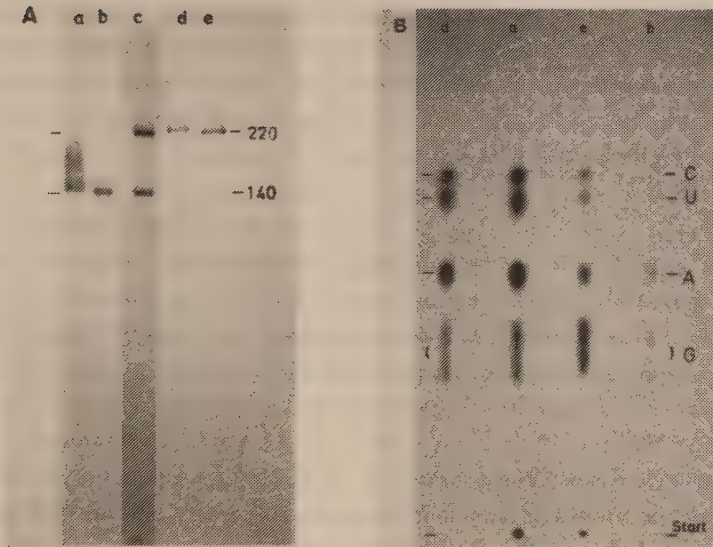


Fig. 25 Eluierte, markierte Untereinheiten
Gelelektrophorese und chromatographische Analyse nach
Verdauung mit RNase T2

50 µg RNA Polymerase wurden mit 0,5 mM pHB-ATP, 16 µg Plasmid-DNA (cg2RR329), je 50 µM ATP, CTP und GTP, sowie 0,5 µM [α - 32 P]UTP (1200 Ci/mMol) und schließlich 1 mM NaBH₄ in 300 µl Gesamtvolumen wie im Text (Kap.3.1) beschrieben umgesetzt. Eine Hälfte des Ansatzes blieb ohne weitere Behandlung, während die andere 15 min bei 37°C mit 10 µg/ml RNase A verdaut wurde. Nach der Elektrophorese wurden in beiden Fällen die beiden markierten Untereinheiten aus dem SDS-Polyacrylamidgel eluiert: W220 bzw. W140 und W220R bzw. W140R (s. Methoden).

- A** Eine Probe der eluierten, markierten Untereinheiten wurde über ein 5 - 12% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisiert.
- | | | | |
|---|-------|---|-------|
| a | W140 | d | W220 |
| b | W140R | e | W220R |
- c Untereinheiten der RNA Polymerase in einer Vergleichsbahn, mit Coomassie gefärbt. Die Pfeile am Rand kennzeichnen die Positionen von W220 und W140.
- B** Eine weitere Probe der Eluate wurde jeweils mit 1 U RNase T2, 37°C, 60 min verdaut und im System PEI-Cellulose / 0,5 M NaHCO₃ pH 3,6 aufgetrennt. Zu jeder Chromatographie wurden alle vier unmarkierten 3'-Nukleosidmonophosphate zugesetzt; die Positionen der UV-Absorption sind am Rand angegeben (3'-GMP ist genauso unscharf wie das radioaktive Signal, da zuviel unmarkierte Verbindung aufgetragen worden war).

Eine Verdauung dieser Eluate mit RNase T2 führt in allen Fällen zu allen vier 3'-Nukleosidmonophosphaten, wie eine chromatographische Analyse der Reaktionen zeigt (Fig. 25 B a-d). Dadurch ist die Markierung an beiden Untereinheiten als RNA identifiziert, die alle vier N³pU-Bindungen enthält.

Damit ist allerdings nicht die Frage nach der Art und Länge der RNA-Ketten beantwortet, deren Bindung an die Polypeptide nach den Kontrollexperimenten über die reaktive Gruppe des Nukleotidderivats am 5'-Ende erfolgte. Die gleiche Strategie wie im Fall der funktionellen Affinitätsmarkierung (Kap. 2.1.3) sollte deshalb zur Abspaltung der RNA verfolgt werden.

Der Polypeptidanteil der markierten Untereinheiten wurde zuerst mit Proteinase K verkleinert und dann die RNA mit saurer Pyrophosphatase aus Tabak und alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm abgespalten und dephosphoryliert.

Die Analyse dieser Verdauungen in einem 25% Sequenzgel zeigt für W220 und W140 heterogene Radioaktivität mit einer Bandenstruktur vom Dinukleotidbereich bis zu einer Mobilität von mindestens 50 Nukleotiden, während sie bei W220R und W140R, die nach der Markierungsreaktion, aber vor der Denaturierung mit RNase A behandelt worden waren, einfacher zusammengesetzt scheint und bis höchstens 20 Nukleotide reicht (Fig. 26 Bahnen a).

Mehrere Kontrollexperimente sollten sicherstellen, daß die gefundene Radioaktivität zumindest im wesentlichen reine RNA-Spezies darstellt und ihre Mobilität damit direkt mit Nukleotidlängen verglichen und ausgedrückt werden kann.

Von RNase T2, die unspezifisch jede Phosphodiesterbindung eines RNA-Moleküls spaltet, wurden alle Signale von W220 und W140 vollständig abgebaut⁴, während sie gegenüber DNase I durchweg resistent waren (Fig. 26 Bahnen d,f).

⁴Nach der chromatographischen Analyse entstehen bei dieser Verdauung alle vier 3'-Nukleosidmonophosphate (Fig. 25 B a-d), die unter den gewählten Elektrophorese-Bedingungen aus dem Gel wandern.

Die zusätzliche Verdauung der Eluate mit Pronase führt im Fall von W140 und W140R und auch bei W220 und W220R mit wenigen Ausnahmen - einige Banden ändern hier ihre Mobilität - zu keiner Änderung der Bandenmuster (Fig. 26 Bahnen a vs. e).

Interessant ist die nachträgliche RNase A-Verdauung der markierten Untereinheiten in der Reihenfolge Proteinase K, Pyrophosphatase, RNase A und alkalische Phosphatase.

Im Fall der vor der SDS-Denaturierung nicht mit RNase A behandelten W220 und W140 wird die hochmolekulare Radioaktivität vollständig abgebaut und akkumuliert statt dessen im Bereich von niederen Oligonukleotiden. Eine wiederum nachgeschaltete Pronase-Verdauung zeigt, daß lediglich bei W220 eine prominente Bande sensitiv, also sicher nicht reine RNA ist (Fig. 26 Bahnen b,c).

Im Fall der bereits vor der SDS-Denaturierung, Auftrennung und Elution mit RNase A behandelten W220R und W140R tritt keine Veränderung der Banden durch die nochmalige RNase A-Verdauung der Eluate auf (Fig. 26 Bahnen b,c).

Diese Befunde und die Vergleiche der RNase A-Produkte von W220 bzw. W140 mit denjenigen von W220R bzw. W140R ergeben, daß die ursprüngliche RNase A-Behandlung des markierten, nativen Enzyms bereits das finale RNase A-Muster erzeugte. Das bedeutet, alle möglichen RNase A-Spaltstellen waren auch im nativen Zustand zugänglich und nicht bis zu einer bestimmten Länge von der Polymerase gegen eine Verdauung geschützt. Selbst die bei W220/RNase A gefundene Pronase-sensitive Bande ist im Fall von W220R und W220R/RNase A reproduzierbar und wird durch Pronase gleichartig gespalten (Fig. 26 W220 b,c vs. W220R a,b,c,e).

Die zusätzlichen Banden im Bereich niederer Oligonukleotide bei W220/RNase A bzw. W140/RNase A gegenüber W220R/RNase A bzw. W140R/RNase A (Fig. 26 Bahnen b) bestätigen diese Argumentation.

Fig. 26 Gelelektrophoretische Analyse von enzymatischen Verdauungen der markierten *W220, *W220R, *W140 und *W140R

Alle vier Eluate wurden mit Proteinase K und saurer Pyrophosphatase verdaut (s. Methoden; Fig. 25). Diese wurden nach den angegebenen weiteren enzymatischen Behandlungen über ein 25% Sequenzgel elektrophoretisiert (s. Methoden). Zu den Reaktionen wurden 3,5 bis 5,5 µl Proben in einem Gesamtvolumen von etwa 10 µl eingesetzt. Alle Inkubationen geschahen bei 37°C.

Als Längenmarker wurden die dephosphorylierten Produkte einer Reaktion von Weizenkeim RNA Polymerase II mit je 200 µM ATP und [α - 32 P]UTP an pSS (Mosig, 1988; Werr *et al.*, 1985) als DNA-Matrize, die eine Nukleotidleiter erzeugen und mit *M. luteus* RNA Polymerase synthetisiertes ApU/ApUpU verwendet (s. Methoden).

- a 1,3 U alkalische Phosphatase, 30 min
- b 0,15 µg RNase A, 20 min + 2,7 U alkal. Phosphatase, 20 min (siehe c)
- c eine Hälfte von b + 0,5 µg Pronase, 20 min
- d 1 U RNase T2, 30 min
- e 1,3 U alkal. Phosphatase, 20 min + 0,5 µg Pronase, 15 min
- f 1,3 U alkal. Phosphatase, 20 min + 0,05 µg DNase I, 15 min

W220

a b c d e f a b c e

W220R

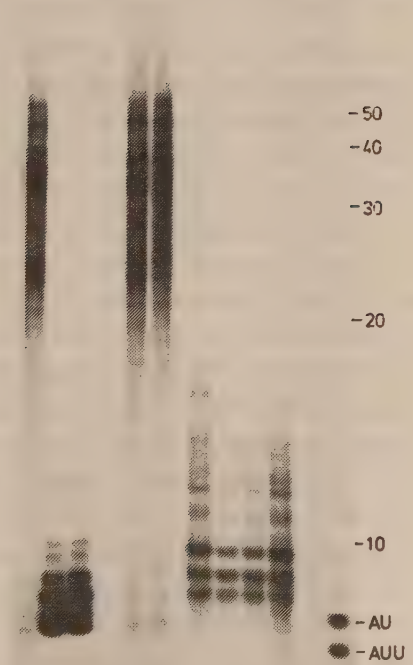
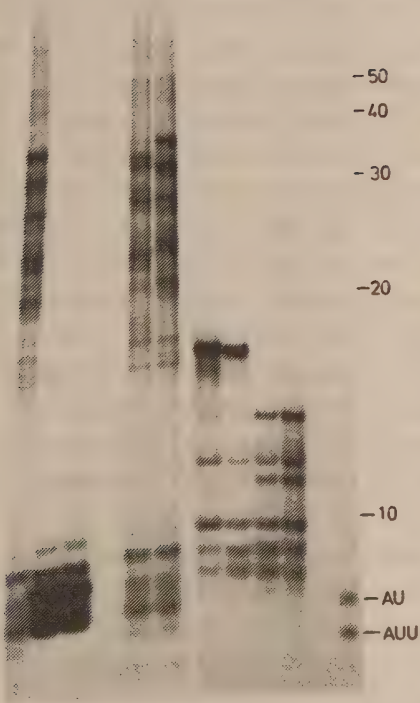
a b c e

W140

a b c d e f a b c e

W140R

a b c e



Im Fall von W140R und W220R wurden demnach bereits vor der Denaturierung der Polymerase und der nachfolgenden Isolierung der markierten Untereinheiten die gebundenen RNA-Ketten durch RNase A bis zum ersten Pyrimidin vom 5'-Ende aus gesehen abgetrennt, während bei W140 und W220 die gebundene RNA vollständig erhalten blieb und bei der nachfolgenden RNase A-Behandlung der eluierten Untereinheiten zu einer Reihe weiterer Spaltprodukte Anlaß gab. Aufgrund der Pyrimidinspezifität der RNase A und der Verwendung von [α - 32 P]UTP als radioaktives Substrat muß man unter der Annahme einer vollständigen und spezifischen Verdauung für alle diese Produkte (Purin) $_x$ *pU-Strukturen ($x = 1$ bis n) erwarten.

Zusammenfassend lassen die Beobachtungen den Schluß zu, daß die Markierungen der beiden größten Untereinheiten W220 (W180) und W140 auf längere RNA-Ketten bis zu 50 Nukleotiden zurückzuführen sind und kein erkennbarer Unterschied zwischen den an W220 und W140 gebundenen Spezies besteht. Die gebundenen RNA-Moleküle werden auch ohne Denaturierung des Enzyms von RNase A gespalten und verkürzt, womit sich die Vermutung aufgrund des analytischen Befundes einer erhöhten Mobilität im SDS-Polyacrylamidgel nach dieser Verdauung bestätigt (vgl. Fig. 24 b,c und 25 A).

Zur Angabe der Nukleotidlänge ist zu bemerken, daß unter den Produkten hybride Strukturen Aminosäure $_x$ ~RNA nicht völlig ausgeschlossen werden können⁵, die wegen ihrer veränderten Ladungsdichte und Größe möglicherweise höhere RNA-Moleküle vortäuschen.

Zur Interpretation der gebundenen RNA gibt es verschiedene Möglichkeiten. An unwahrscheinlichsten ist eine völlig unspezifische Anheftung von bereits freigesetzter RNA; die Bindung erfolgt zwar an die beiden weitaus größten Polypeptide, doch stellen auch sie nur 60% des Gesamtproteins der Polymerase dar ($220k + 140k / 600k = 0,60$), wodurch sich die gefundene eindeutige Spezifität der Markierung nicht erklären ließe. Dennoch könnte es sich um synthetisierte und schon freigesetzte RNA handeln, die

⁵Vor allem die Struktur mit $x = 1$ wäre auch resistent gegen Pronase.

eine bevorzugte Affinität zu W220/W140-Bereichen der Polymerase hat und deshalb dort fixiert wurde.

Die attraktivste Alternative wäre allerdings die Bindung einer naszierenden RNA auf einem vorgegebenen Weg vom katalytischen Zentrum durch die Polymerase in die umgebende Lösung. Diesen Weg würden W220 und W140 bilden, da die RNA ausschließlich an diesen beiden Untereinheiten gebunden wurde.

Eine derartige Interpretation stünde auch mit den Ergebnissen von Hanna und Meares (1983b) in Einklang, die die Bindung der 5'-Enden der am Al-Promotor auf T7D111 DNA naszierenden RNA an *E. coli* RNA Polymerase Untereinheiten und die Matrize verfolgten. Sie fanden an α keine Markierung, σ trug in geringem Ausmaß ein Trinukleotid, während β' und β intensiv durch RNA-Ketten von 12 bis 94 Nukleotiden markiert waren; RNA-Moleküle bis zu 12meren waren überwiegend an die DNA-Matrize und zu einem geringen Teil an β' und β gekoppelt⁶. Daraus schlossen sie, daß das 5'-Ende der RNA innerhalb der geschmolzenen DNA-Region gebunden wird und der Weg der naszierenden RNA entlang von β' und β liegt.

Die früheren Untersuchungen der erwähnten sowjetischen Gruppen (Sverdlov *et al.*, 1978; Sverdlov & Tsarev, 1980; Grachev & Zaychikov, 1981) ergeben kein klares Bild. Sie fanden in Abhängigkeit vom verwendeten Derivat, dem(n) Promotor(en) und der Nukleotidkombination Markierungen der Untereinheiten β' und β oder β' , β und σ oder β und σ , in zwei Fällen sogar auch von α . Nur in einem Fall, der zur Markierung von β und σ führte, charakterisierten sie ähnlich wie Hanna und Meares (1983b) die Längen der gebundenen RNA nach einer Abspaltung von den Untereinheiten (Grachev & Zaychikov, 1981).

⁶Die DNA wurde in meinen Versuchen nicht untersucht; allerdings ist ihre Markierung mit dem Aldehyd-Nukleotidderivat weniger wahrscheinlich, da in Abwesenheit oder Gegenwart von RNA Polymerase keine kovalente Bindung an 5'-[α -³²P]DNA gefunden wurde (s. Kap. 2.1.5.3.).

Weitere mögliche Fragen, die unter Umständen auch zur Entscheidung zwischen diesen Möglichkeiten beitragen können, wurden experimentell im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr angegangen. Würde etwa der direkte Vergleich der gebundenen RNA mit der freigesetzten RNA⁷ tendenziell nur größere RNA-Spezies in der Lösung ergeben, so wäre das ein deutlicher Hinweis auf die Bindung naszierender RNA an W140 und W220, während ab einer bestimmten Länge das 5'-Ende des Produkts nicht mehr an die Polymerase gebunden wird. Eine derartige Untersuchung könnte auch auf spezifisch initiierende Systeme, z.B. T7 oder *E. coli* RNA Polymerase ausgedehnt werden, wo man die Möglichkeit einer direkten oder indirekten (durch eine geeignete Abfolge der transkribierten Nukleotide) Sequenzierung hätte.

⁷Der RNase A-sensitive Hintergrund bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Fig. 24 b,c) belegt die erfolgte Bildung und Freisetzung von RNA.

DISKUSSION

Die nach einer Auftrennung über SDS-Gele erkennbare ähnliche Architektur von eubakteriellen und der drei Klassen von eukaryotischen RNA Polymerasen mit zwei Untereinheiten einer relativen Molmasse größer als 120000 und einer unterschiedlichen Zahl relativ kleinerer Polypeptide deutet auf eine Äquivalenz und evolutionäre Verwandtschaft zumindest der beiden jeweils größten Untereinheiten hin (Sentenac & Hall, 1982; Sentenac, 1985; Arma-leo, 1987).

Zahlreiche immunologische Studien konnten dies zwar nicht immer eindeutig, aber in seiner Grundtendenz bestätigen¹.

Keine Bestätigung erfuhr die Verwandtschaftshypothese durch vergleichende *Fingerprint*-Analysen, doch ist dies wegen der Größe der Polypeptide und der damit zu erwartenden Komplexität kein überzeugendes Gegenargument (Kidd *et al.*, 1979).

¹Durch immunologische Untersuchungen mit polyklonalen Antikörpern gegen native oder denaturierte RNA Polymerasen und einzelne Untereinheiten sowie mit monoklonalen Antikörpern, die gegen isolierte Untereinheiten gerichtet sind, konnte die Verwandtschaftshypothese unterstützt werden. So treten bei Enzymen innerhalb einer Klasse (d.h. eubakterielle bzw. eukaryotische Polymerasen I, II oder III) meist ausgeprägte Kreuzreaktionen auf (Weeks *et al.*, 1982; Huet *et al.*, 1982a; Guilfoyle *et al.*, 1983), zwischen äquivalenten Untereinheiten der Polymerasen verschiedener Klassen eines oder mehrerer Organismen dagegen oft nur sehr schwache oder sogar gar keine (Buhler *et al.*, 1980; Huet *et al.*, 1982a, 1985; Guilfoyle *et al.*, 1983). Dem Vorteil der immunologischen Studien, daß auch verwandte, aber nicht exakt gleiche Strukturen nachgewiesen werden können, steht der Nachteil gegenüber, daß homologe Bereiche aufgrund einer schwachen Antigenizität unentdeckt bleiben können (vgl. Huet *et al.*, 1982b).

Der Terminus eubakteriell ist hier und im folgenden nur für gram-negative Organismen richtig angewendet, während für gram-positive Bakterien die elektrophoretischen Mobilitäten der beiden größten Untereinheiten β' und β umgekehrt sind, d.h. β erscheint als größte, β' als zweitgrößte Untereinheit (Zillig *et al.*, 1985). Die funktionelle Affinitätsmarkierung der Polymerase aus dem gram-positiven *Lactobacillus curvatus* bestätigt diese Beobachtung, β wird als größte Untereinheit markiert (A. Lindner & G.R. Hartmann, pers. Mitteilung), so daß dafür alle Aussagen entsprechend umgekehrt werden müssen.

Neueste Untersuchungen, die die Primärstruktur aus den DNA-Sequenzen der entsprechenden Gene ableiten, bestätigen eindeutig die strukturelle Homologie der größten Untereinheit der Polymerasen II aus *Drosophila* und Hefe, der Polymerase III aus Hefe und sogar des Enzyms aus Vaccinia Virus zur β' Untereinheit von *E. coli* und der zweitgrößten Untereinheit der Polymerasen II aus *Drosophila* und Hefe zur β Untereinheit aus *E. coli* (Allison *et al.*, 1985; Biggs *et al.*, 1985; Broyles & Moss, 1986; Nonet *et al.*, 1987; Falkenburg *et al.*, 1987; Sweetser *et al.*, 1987; s. u.). Weitere Daten, auch zu RNA Polymerasen I liegen noch nicht vor.

Dennoch ist im Kontext aller dieser Untersuchungen die strukturelle Homologie der beiden, jeweils größten RNA Polymerase Untereinheiten weitgehend akzeptiert. Auf dieser lastet anscheinend auch ein größerer Selektionsdruck als auf der Konservierung der kleineren Polypeptide (Riva *et al.*, 1982). Die Divergenz wird mit unterschiedlichen Entwicklungen von Regulationsmechanismen in Verbindung gebracht (Sentenac, 1985).

Die in dieser Arbeit angewandte Technik der funktionellen, autokatalysierten Affinitätsmarkierung (Smirnov *et al.*, 1981, 1984; Grachev & Mustaev, 1982; Grachev *et al.*, 1987a) belegt dagegen eindeutig, daß jeweils die zweitgrößte Untereinheit (M_r 124k - 150k) der Weizenkeim RNA Polymerase II, aller drei nukleären RNA Polymerasen I, II und III aus der Hefe *S. cerevisiae* und des Enzyms aus dem Cyanobakterium *Anabaena* mit einem Nukleotid wechselwirken, das nur aufgrund seiner Funktion in einem katalytisch aktiven Enzym nachgewiesen wurde, nämlich als Startnukleotid für eine enzymatische, matrizenabhängige Bildung einer Phosphodiesterbindung zu dienen. Die Dimensionen des potentiell von der Markierung betroffenen Bereichs innerhalb des Enzyms können mit Hilfe der Summe der maximalen Längen des reaktiven Arms am Derivat und der Seitenkette der gebundenen Aminosäure auf wenige Prozent des Gesamtvolumens oder der schematischen Oberfläche

einer RNA Polymerase abgeschätzt werden². Es handelt sich also um eine starke Eingrenzung dieser Domäne(n) am aktiven Zentrum. Die markierten Untereinheiten sind zueinander und auch zur β Untereinheit der *E. coli* RNA Polymerase (Grachev *et al.*, 1987a) funktionell homolog. Dadurch wird die bisherige auf der strukturellen Verwandtschaft beruhende Evidenz für einen gemeinsamen Ursprung der eubakteriellen und eukaryotischen RNA Polymerasen, deren drei nukleäre Formen durch eine Triplikation der Gene für die beiden größten Untereinheiten entstanden sein sollen (Sentenac & Hall, 1982; Sentenac, 1985), in funktioneller Hinsicht erweitert und bestätigt. Da alle Markierungen mit einem Aldehyd-Nukleotidderivat möglich, aber nur nach einer NaBH_4 -Reduktion stabil waren, muß sich darüberhinaus jeweils mindestens eine primäre Aminogruppe, ein Lysin-Rest, geeignet am aktiven Zentrum befinden mit dessen freier Aminogruppe eine Iminbildung erfolgen kann. Die alternative Bindung an die N-terminale Aminogruppe ist im Fall der eu- und prokaryotischen Enzyme unwahrscheinlicher, insbesondere nach den Ergebnissen von Grachev *et al.* (1985, 1987b,d; s.u.). Posttranslational-modifizierte Aminosäuren mit primären Aminogruppen sind nicht bekannt (Wold, 1981).

Viele Ergebnisse der konventionellen, statischen Techniken zur Affinitätsmarkierung, die allerdings mit den in der Einleitung genannten Vorbehalten hinsichtlich der Unterscheidung von unspezifischen Bindungen zu sehen sind, stehen in erster Näherung im Einklang mit dieser funktionellen Lokalisierung des aktiven Zentrums. Sie wiesen in verschiedenen Systemen eine Wechselwirkung der beiden oder einer der größten Untereinheiten mit den Substraten und der Matrize nach³ (vgl. Einleitung), wie auch eine

²Die vektorielle Addition der maximalen Länge des Arms an den Derivaten, gerechnet vom 5'-C-Atom der Ribose im aktiven Zentrum bis zum C-Atom der reaktiven Aldehydgruppe, und der Seitenkette von Lysin (s.u.), vom α -C-Atom bis zum ϵ -N-Atom, ergeben Radien von $1,9 \pm 0,4$ nm, d.h. Kreise mit $11,3$ nm² bzw. Halbkugeln mit $14,4$ nm³ um das 5'-C-Atom der Ribose im Vergleich zur schematischen Oberfläche von etwa 530 nm² bzw. einem Volumen von 675 - 790 nm³ (core-, holo-Enzym) der *E. coli* RNA Polymerase als Prototyp (Heumann *et al.*, 1982).

³Eine Übereinstimmung hinsichtlich der genauen Modifizierungsstelle(n) innerhalb der Polypeptidketten muß allerdings nicht bestehen.

direkte Vernetzung dieser beiden Polypeptidketten miteinander (Bateman & Nicholson, 1984a).

Interessant sind auch die kürzlich von Anton Lindner durchgeführten Experimente an archaebakteriellen Enzymen, die zur funktionellen Affinitätsmarkierung der größten Untereinheit B aus RNA Polymerasen Schwefel-abhängiger und der zweitgrößten Untereinheit B' aus Enzymen halophiler, methanogener oder Schwefel-reduzierender Organismen führte (Thomm *et al.*, 1988; A. Lindner & G.R. Hartmann, pers. Mitteilung). Aufgrund von immunologischen Kreuzreaktionen waren diese Untereinheiten bereits als strukturell verwandt zu den zweitgrößten Untereinheiten der Hefe RNA Polymerasen I und II und der *E. coli* RNA Polymerase klassifiziert worden. Bei den nicht Schwefel-abhängigen Organismen wird zusätzlich noch eine weitere Untereinheit, B'', erkannt, so daß eine Spaltung der antigenen Determinanten in zwei Polypeptide, nämlich B' und B'', vorliegt (Zillig *et al.*, 1985). Die Ergebnisse von Thomm *et al.* (1988) haben daher angesichts der weiteren Lokalisierung der Affinitätsmarkierung in der C-terminalen Region der β Untereinheit der *E. coli* RNA Polymerase durch Grachev *et al.* (1985, 1987b,d; s.u.) die Konsequenz, daß B' diesen C-terminalen Bereich enthalten müßte und die diskutierte evolutionäre Spaltung $B = B' + B''$ (Zillig *et al.*, 1985) entsprechend erfolgt sein sollte.

Eine besondere Beachtung verdient die zusätzliche Affinitätsmarkierung des Initiationsfaktors σ der *Anabaena* RNA Polymerase mit verschiedenen Aldehyd-Nukleotidderivaten (s. Kap. 2.4.), die bei anderen Prokaryoten nur mit alkylierenden Analoga bei *E. coli* beobachtet wurde (Grachev *et al.*, 1987a). Eine einfache Erklärung dafür wäre ein geeignet positionierter Lysin-Rest, der in den σ Untereinheiten der übrigen Prokaryoten fehlt. Ein weiterer Grund könnte die im Vergleich zu anderen Prokaryoten verschiedene Organisation und Struktur der cyanobakteriellen Enzyme mit

einem zusätzlichen integralen und stöchiometrischen Bestandteil der RNA Polymerasen sein (Untereinheit gamma, p66: Schneider *et al.*, 1987; vgl. auch Herzfeld & Kiper, 1976) und damit auch eine mögliche andere Struktur und Funktion des σ Faktors.

Diese Möglichkeit zur Affinitätsmarkierung des Initiationsfaktors könnte gezielt, etwa durch verschiedene Längen der reaktiven Arme der Derivate, auch für andere Systeme zu einem funktionellen *cross-linking* weiterentwickelt werden: die chemisch reaktive Gruppe des Derivats bindet an einen Initiationsfaktor, während sein zweites Ende ins aktive Zentrum reicht, um dort durch die Katalyse einer Phosphodiesterbindung gekennzeichnet zu werden. Für die so identifizierten Faktoren ist damit auch ihre direkte Wechselwirkung mit der RNA Polymerase einschließlich ihres maximalen Abstandes (5'- bis 3'-Ende des Derivats) vom aktiven Zentrum nachgewiesen. Da die Affinitätsmarkierung die Promotorspezifität zumindest nicht prinzipiell (zer)stört (s. Kap. 2.5.2.2.), könnte zur Selektion auf Spezifität vermittelnde Faktoren eine den mRNA-Start entsprechende Dinukleotidsynthese ähnlich der in Kap. 2.5.2.2. durchgeführten Analyse dienen.

Völlig andere und einfachere Organisationen und Strukturen als die pro- und eukaryotischen Enzyme haben DNA-abhängige RNA Polymerasen aus Bakteriophagen entwickelt, obwohl sie die gleichen katalytischen Funktionen erfüllen (Chamberlin & Ryan, 1981). Ein möglicher Grund dafür ist die weit geringere Komplexität der Phagengenome sowohl in Bezug auf ihre Größe und Organisation als auch auf die Regulation der Transkription.

Vertreter aus drei, untereinander wiederum völlig verschiedener derartiger Enzymklassen aus Coliphagen, die aus einem einzigen Polypeptid mit Mr 320k bestehende N4 Virion RNA Polymerase, die ebenfalls aus einem einzigen, mit etwa 100k allerdings kleineren Polypeptid aufgebauten zueinander eng verwandten Enzyme aus T7 und T3 und die kleinste bekannte DNA-abhängige RNA Polymerase, die N4-kodierte Aktivität II mit einer 40k und einer 30k Untereinheit, konnten mit Hilfe der autokatalysierten Affinitätsmar-

kierung, jeweils mit Aldehydderivaten, erfaßt werden. Im Fall der N4 Polymerase II war das 30k Polypeptid betroffen.

Dies ist aus mehreren Gründen interessant. Technisch gesehen weist es auf die universelle Anwendbarkeit der Methode hin. Sie ist also nicht auf Polymerasen des pro- und eukaryotischen Aufbaus beschränkt. Vor allem eröffnet sich aber die Möglichkeit durch eine genaue Lokalisierung der Markierung innerhalb der betroffenen Polypeptide Vergleiche der Struktur der aktiven Zentren der unterschiedlichen Enzyme und damit auch ihres evolutionären Zusammenhangs zu erstellen. Diese Untersuchungen können verschiedene oder umgekehrt, trotz der offensichtlichen strukturellen Divergenz ähnlich organisierte Topographien und Mechanismen der aktiven Zentren ergeben (s.u.). Die überraschende Sequenzhomologie der kernkodierten mitochondrialen RNA Polymerase aus Hefe zu den T7 ähnlichen Enzymen (Masters *et al.*, 1987) läßt diese Frage noch dringender erscheinen. Als minimale, aber triviale Forderung zur Gemeinsamkeit kann man vorerst einen Lysin-Rest in der Nähe des aktiven Zentrums konstatieren (s.o.). Ein entscheidender erster Schritt zur weiteren, genaueren Lokalisierung gelang Grachev *et al.* (1985; 1987b,d). Die grundlegende Voraussetzung für diese und die im folgendem diskutierten Techniken ist allerdings die kovalente Bindung des durch die Katalyse markierten Nukleotidderivats in einem gegenüber der Auflösung der Methode hinreichend kleinen Bereich und nicht - gleichzeitig mit einem Derivat - an mehrere voneinander getrennte Domänen, die nur durch die Peptidfaltung benachbart waren.

Grachev *et al.* (1985; 1987b,d) spalteten die markierte und denaturierte β Untereinheit der *E. coli* RNA Polymerase limitiert mit BrCN (an Methionin; Gross, 1967), so daß statistisch nur Einfachspaltungen erfolgten. Von dem dabei jeweils gebildeten N- und C-terminalen Fragment enthält unter der oben genannten Voraussetzung nur eines, je nach Lage der Schnittstelle die Markierung und ist nach der gelelektrophoretischen Auftrennung in der Autoradiographie sichtbar. Da die Positionen der möglichen

<i>S. cerevisiae</i> 962- 979	<u>K</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>K</u>
<i>D. melanogaster</i> 866- 883	<u>K</u> <u>F</u> <u>C</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>K</u>
<i>E. coli</i> 1048-1065	<u>K</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>K</u>
T7 441- 454	<u>K</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>G</u> - <u>K</u>
448- 461	<u>K</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>G</u> - <u>K</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>K</u>
700- 718	<u>K</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>I</u>
711- 724	<u>K</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>C</u> <u>A</u>

Fig. 27 Verwandte Sequenzbereiche von RNA Polymerasen

Der Sequenzausschnitt aus der *E. coli* RNA Polymerase zeigt den von Grachev *et al.* (1987b) identifizierten Bereich, an den die Radioaktivität nach einer funktionellen Affinitätsmarkierung mit oHB-GTP und [α - 32 P]UTP gebunden wurde und der deshalb im oder in der Nähe des aktiven Zentrums liegen sollte. Dazu homologe Regionen erscheinen in den Sequenzen der zweitgrößten Untereinheiten der RNA Polymerasen II aus der Hefe *S. cerevisiae* und aus *Drosophila melanogaster*. Keine Homologien, aber ähnlich aufgebaute Bereiche findet man in der Aminosäure-Sequenz der T7 RNA Polymerase. Die Sequenz für *Drosophila* wurde nach Falkenburg *et al.* (1987; insgesamt 1123 Aminosäuren), für Hefe nach Sweetser *et al.* (1987; insgesamt 1224 Aminosäuren) und für T7 nach Stahl & Zinn (1981; insgesamt 883 Aminosäuren) angegeben. Die basischen Aminosäuren Arginin und besonders Lysin sind unterstrichen.

Spaltstellen aus der Primärsequenz bekannt sind und nicht symmetrisch zur Mitte der Polypeptidkette liegen (Ovchinnikov *et al.*, 1981), können die Fragmente im beobachteten, kombinierten Muster durch Vergleich mit den theoretischen Fragmentgrößen als C- oder N-terminal klassifiziert werden. Die Markierung muß zwischen der Spaltstelle des kleinsten beobachteten C-terminalen und der des kleinsten N-terminalen Fragments gebunden sein. Damit konnten zwei Regionen als Angriffspunkte von verschiedenartigen Deriva-

ten innerhalb der 1342 Aminosäuren enthaltenden β Untereinheit gefunden werden: ein Bereich zwischen Gly¹²²⁸ bis Met¹²⁴³ wird z.B. von AtmP (His¹²³⁷) oder AB-ADP, AB-ATP (Lys¹²³⁴ oder 1242) erfasst; der zweite erstreckt sich von Ile¹⁰³⁶ bis Met¹⁰⁶⁶, enthält vier Lysin-Reste (Lys^{1048,1051,1057} oder 1065) als potentielle Bindungsstellen und wird z.B. von pHB-ATP gebunden (Grachev *et al.*, 1987b,d; s. Fig. 27).

Homologe Sequenzen zu beiden Bereichen treten am C-Terminus der beiden sequenzierten eukaryotischen Untereinheiten auf (Fig. 27). Daher liegen die Vorhersagen nahe, daß diese Regionen dort analog zum aktiven Zentrum beitragen und auch ihre Entsprechung in anderen, nicht sequenzierten Polymerase-Untereinheiten (z.B. Hefe RNA Polymerase I, III, Weizenkeim RNA Polymerase II) haben. Der Vergleich mit der Aminosäuresequenz der T7 RNA Polymerase beschränkt sich hier auf einen der beiden Bereiche, auf Lys¹⁰⁴⁸ bis Lys¹⁰⁶⁵, kann aber entsprechend für den anderen diskutiert werden. Die Aminosäureabfolge der T7 (oder auch T3) RNA Polymerase zeigt dazu keinerlei direkte Sequenzhomologien. Dagegen findet man aber ähnlich aufgebaute Regionen, wenn man nach einer vergleichbaren Häufung und Anordnung von Lysin- oder Arginin-Resten sucht: Ein Bereich umspannt die Aminosäuren 441 bis 461, ein weiterer 700 bis 724 des T7 Enzyms (Fig. 27); darüberhinaus gibt es noch zwei weitere, ähnliche Regionen von Aminosäure 329 bis 345 und von 608 bis 631 (vgl. Sequenz in: Stahl & Zinn, 1981).

Eine experimentelle Bestätigung dieser Hypothese(n) würde trotz aller Unterschiede in der Primärstruktur und der Organisation der DNA-abhängigen RNA Polymerasen eine Coevolution des aktiven Zentrum - oder eine eingeschränkte Divergenz in Bezug auf dieses - bedeuten. Ein unabhängiges Argument für eine zumindest bedeutende Rolle der Region 441 bis 461 des T7 Enzyms ist die Tatsache, daß sie innerhalb des größten zusammenhängenden Homologiebereichs der T7/T3 Enzyme mit der mitochondrialen RNA Polymerase aus Hefe liegt (Masters *et al.*, 1987).

Da die Sequenz der T7 RNA Polymerase bekannt ist, kann man die oben dargestellte Analyse zur genaueren Lokalisierung (Grachev *et al.*, 1985) mit diesem Enzym genauso durchführen. Zusätzlich können aber auch andere chemische Reagentien (Han *et al.*, 1983) zur Spaltung eingesetzt werden. Für erste Untersuchungen besonders interessant erscheinen darunter solche, die eine Dipeptidsequenz oder seltene Aminosäuren erkennen und ein entsprechend grobes, aber weniger komplexes Raster erzeugen. Hydroxylamin spaltet zwischen den Aminosäuren Asn/Gly, eine Sequenz, die im T7 Enzym (883 Aminosäuren) nur zweimal an Position 289/290 und bei 588/589 vorkommt⁴. Dadurch wird die Peptidkette in drei fast gleich große Bereiche eingeteilt: N-Terminus bis 289, 290 bis 588 und 589 bis C-Terminus. Aus einer Trypsinolyse des nativen Enzyms ist bereits bekannt, daß die Markierung nicht innerhalb der ersten etwa 170 Aminosäuren ausgehend vom N-Terminus gebunden ist (s. Kap. 2.5.2.1.). Eine parallele Spaltung der intakten und der so um etwa 20k verkürzten Polypeptidkette sollte deshalb für jede theoretisch mögliche Lage der radioaktiven Markierung eine eindeutige Fragmentzusammensetzung erzeugen⁵. Anhand des tatsächlich gefundenen Musters ließe sich also das Drittel angeben, das die Markierung trägt.

Falls die Sequenz eines durch die Affinitätsmarkierung erfaßten Polypeptids nicht bekannt ist (z.B. W140), so wäre eine analoge Analyse dann möglich, wenn eine Klassifizierung der Spaltprodukte als N- oder C-terminal erfolgen könnte. Eine Technik zur Fluoreszenz-Markierung des Aminoterminus haben Jue und Doolittle

⁴Vorversuche haben ergeben, daß unter den Spaltbedingungen (1-2 M NH₂OH, pH 9,2) die Markierung selbst nicht abgespalten wird (Michael Katzameyer, pers. Mitteilung).

⁵Theoretisch treten mit dem intakten bzw. am N-Terminus verkürzten Polypeptid folgende Längen [Aminosäuren] an radioaktiven Spaltstücken auf; falls neben Einfach- auch Zweifachspaltungen erzeugt werden, erscheint lediglich in einem Fall das in Klammern angegebenen zusätzliche Fragment:

Markierung		
im Rest des N-term. Drittels	588, 289	bzw. 418, 119
im mittleren Drittel	593, 588, (299)	bzw. 593, 418, (299)
im C-term. Drittel	593, 294	bzw. 593, 294

(1985) beschrieben. In Anbetracht der Tatsache, daß die nach den Ergebnissen von Grachev *et al.* (1985, 1987b) postulierten Bereiche näher am C-Terminus liegen (Fig. 27), ist aber auch eine Kennzeichnung dieses Endes besonders interessant. Dies könnte zum einen durch eine enzymatische Verkürzung mit Hilfe von Carboxypeptidasen erfolgen:

Eine limitierte chemische oder enzymatische Spaltung der nicht radioaktiven Polypeptidkette, die auch unspezifisch sein kann, muß lediglich ein reproduzierbares Peptidmuster erzeugen. Eine parallele Spaltung des zuvor mit Carboxypeptidasen verdauten Polypeptids sollte das gleiche Muster ergeben mit Ausnahme der ursprünglich C-terminalen Fragmente. Alle Fragmente, die im ersten, aber nicht im zweiten Ansatz auftreten, sollten deshalb als C-terminal klassifiziert sein. Falls die gleiche Spaltung mit der affinitätsmarkierten Polypeptidkette durchgeführt wird, ließe sich die Bindungsstelle der Markierung zwischen der Schnittstelle des kleinsten radioaktiven und der des nächstkleineren, in der Autoradiographie nicht mehr beobachteten C-terminalen Fragments lokalisieren.

Eine Alternative zur Verkürzung mit Carboxypeptidase stellt die umgekehrte Reaktion in Gegenwart eines Überschusses an radioaktiv markiertem Aminosäureamid zur Markierung des C-terminalen Endes dar (Carles *et al.*, 1987).

Das endgültige Ziel dieser Untersuchungen sollte jedoch eine Sequenzierung des markierten Bereichs und die genaue Angabe der betroffenen Aminosäure(n) sein (s. aber Kap. 2.1.4.1.), um noch detaillierte Vergleiche des aktiven Zentrum der DNA-abhängigen RNA Polymerasen im Hinblick auf ihre evolutionäre Beziehung anstellen zu können.

Wie die Versuche mit rohen oder teilweise gereinigten Enzympräparationen aus Weizenkeimen oder Tabakzellkernen (s. Kap. 2.1.6., 2.2.2.) zeigen, ist die Technik auch in diesen Fällen

anwendbar. Dies eröffnet die Möglichkeit unbekannte RNA Polymerase Untereinheiten oder bei einer Auftrennung über native Gele ganze RNA Polymerasen zu identifizieren.

Prinzipiell sollte die Technik auch nicht auf DNA-abhängige RNA Polymerasen beschränkt sein, sondern auch auf RNA-abhängige Enzyme oder entsprechend modifiziert auf DNA Polymerasen übertragbar sein. Damit wären noch umfassendere Vergleiche dieser Polymerasen und ihrer aktiven Zentren möglich. Ein jeweils erster Versuch mit den teilweise gereinigten RNA-abhängigen RNA Polymerasen aus dem Bakteriophagen $\Phi 6$ (zusammen mit M. Ewen und H. Revel, Chicago) und aus dem Killervirus aus Hefe (zusammen mit M. Leibowitz, Piscataway; Thiele *et al.*, 1984) ist vermutlich nur aus Zeitgründen erfolglos geblieben.

ZUSAMMENFASSUNG

Die jeweils zweitgrößten Untereinheiten der RNA Polymerasen II aus Weizenkeimen, aller drei nukleären RNA Polymerasen I, II und III aus der Hefe *S. cerevisiae* und der RNA Polymerase des Cyanobakteriums *Anabaena* sind zueinander und zur β Untereinheit der *E. coli* RNA Polymerase funktionell homolog und tragen zum aktiven Zentrum bei. Diese Aussage, die frühere strukturelle Studien bestätigt und erweitert, stützt sich auf die spezifische autokatalysierte Markierung dieser Untereinheiten mit Hilfe einer von Grachev *et al.* (1986b) für die *E. coli* RNA Polymerase entwickelten Affinitätsmarkierungstechnik zur funktionellen Lokalisierung des aktiven Zentrums. Ein über sein 5'-Ende kovalent mit der Polymerase verknüpftes unmarkiertes Aldehyd-Nukleotidderivat wird dadurch markiert, daß es in einer Matrizen-abhängigen Reaktion als Startnukleotid zur Katalyse einer Phosphodiesterbindung mit einem radioaktiven Nukleosidtriphosphat dient, falls es sterisch korrekt am aktiven Zentrum gebunden wurde.

Die Markierungen der RNA Polymerasen I und II aus Hefe und der Polymerase II aus Weizenkeim zeigten dabei die charakteristischen α -Amanitin-Sensitivitäten dieser Enzyme. Darüberhinaus erlaubt es die Spezifität der Reaktion auch in rohen oder nur teilweise gereinigten Extrakten eine Markierung zu erzielen.

Im Fall der RNA Polymerasen II aus Weizenkeim und Hefe wurde die bei der Markierung mit einem Adenosin-Derivat und [α - 32 P]UTP kovalent an die Untereinheiten W140 bzw. B150 gebundene Radioaktivität als Mischung aus dem Dinukleotid ApU und Trinukleotiden (ApApU; ApUpA, ApUpU) identifiziert.

Andere DNA-abhängige RNA Polymerasen, die nur aus einer Peptidkette bestehenden Enzyme aus den Coliphagen T7 und T3, die auch aus einem einzigen, aber dreimal größeren Polypeptid aufgebaute N4 Virion RNA Polymerase und das kleinste bekannte Enzym dieser

Klasse, die heterodimere 40k/30k N4 Polymerase Aktivität II an seiner 30k Untereinheit können ebenfalls mit der gleichen Technik spezifisch markiert werden. Im Fall der T7 RNA Polymerase spiegelt die Markierung sogar die Initiationspezifität des Enzyms an individuellen T7 Promotoren wider.

Diese Ergebnisse weisen nicht nur auf eine evolutionäre Konservierung der aktiven Zentren der pro- und eukaryotischen RNA Polymerasen hin, sondern schaffen durch die Erfassung von funktionell homologen Domänen in äußerst verschiedenen Systemen die Grundlage, diese Bereiche im Blick auf ihre evolutionäre Verwandtschaft weiter zu untersuchen.

Erste Versuche zur genaueren Lokalisierung der Markierung innerhalb der zweitgrößten Untereinheit des Weizenkeim-Enzyms ergaben ein Peptid mit $M_r \leq 4000$ als Hauptprodukt einer Trypsinolyse. Im Hinblick auf die mögliche Konservierung oder Coevolution der aktiven Zentren wird die im Fall der *E. coli* β Untereinheit bereits gelungene Feinlokalisierung (Grachev *et al.*, 1987b,d) diskutiert und extrapoliert.

Die Untersuchung mit Aldehyd-Nukleotidderivaten erlaubt es den Zeitpunkt seiner irreversiblen Bindung an das Enzym durch die dazu notwendige NaBH_4 -Reduktion zu bestimmen; falls vor der Fixierung des Derivats eine Polymerisation in Gegenwart aller vier Nukleosidtriphosphate erfolgen kann, werden längere RNA-Ketten bis zu 50 Nukleotiden an die beiden größten Untereinheiten der Weizenkeim RNA Polymerase II gebunden.

Ein weiterer Komplex konnte zeigen, daß die abortive Dinukleotidsynthese durch die Weizenkeim RNA Polymerase II zur Bildung aller vier ppp(A,N) bzw. pApN ($N = A, C, G, U$) führt, in ihrer Syntheserate aber stark von den Konzentrationen der beiden Substrate abhängt. Es bestehen Parallelen zur Affinitätsmarkierungsreaktion, die auch mit allen vier Kombinationen aus Adenosin-Derivat und einem $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$ an einer entsprechenden Matrize möglich ist.

A N H A N G

1. Regionale Selektivität der abortiven Dinukleotidsynthese von Weizenkeim RNA Polymerase II

In Kap. 1.1. wurde darauf hingewiesen, daß verschiedene Matrizen zur Synthese unterschiedlicher Dinukleotide führen können, bzw. ein bestimmtes Dinukleotid in variierendem Ausmaß gebildet wird (Mosig *et al.*, 1985; Mosig, 1988).

Eine mögliche Strategie zur Untersuchung des Problems der unterschiedlichen Matrizenaktivität geht von der Dinukleotidsyntheserate an einem definierten DNA-Fragment aus, die mit derjenigen an daraus isolierten Subfragmenten, also verschiedenen DNA-Regionen in Beziehung gesetzt wird.

Dies könnte zur Klassifizierung bestimmter Regionen als besonders aktiv oder inaktiv führen oder auch eine uniforme Syntheserate ergeben und mit Strukturelementen auf der DNA korrelieren.

Als Matrize für derartige Untersuchungen wurde das zum großen Teil sequenzierte Nopalin-Dehydrogenase-Gen auf einem 3,4 kbp langen *Hind*III-Fragment (*Hind*III-23, im Folgenden (a+b+c+d) bezeichnet; Fig. 28) aus dem *Agrobacterium tumefaciens* Plasmid pTiC58 gewählt, das nach einer Infektion durch das Bodenbakterium in den befallenen Pflanzen expremiert wird und damit ein pseudo-pflanzliches Gen darstellt (Depicker *et al.*, 1982; Bevan *et al.*, 1983;).

Bei gleichen Konzentrationen an Nukleosidtriphosphaten führen die Kombination ATP/UTP oder ATP allein an diesem DNA-Fragment zur

stärksten Dinukleotidsynthese im Vergleich aller möglichen Kombinationen (Schäffner, 1984) und wurden deshalb als Substrate für die weiteren Experimente gewählt.

Die Matrizenaktivität bei einer ppp(A,U)-Synthese¹ am gesamten Fragment (a+b+c+d) wurde mit derjenigen an daraus durch Restriktionsschnitte mit *Hind*III, *Ava*I, *Nci*I, *Bam*HI, *Alu*I oder *Hpa*II abgeleiteten Fragmente (a+b+c), (b+c+d), (c+d), (d), (d'), (d'') und (b+c) (Fig. 28) verglichen.

Die Ansätze (25 μ l) wurde mit 0,9 μ g Weizenkeim RNA Polymerase II, je 200 μ M ATP und [α -³²P]UTP (1,0 Ci/mMol) und mit jeweils 7 nM² eines zweifach elektrophoretisch gereinigten DNA-Fragments 4 h bei 37°C inkubiert (s. Methoden). Ein Aliquot dieser Ansätze wurde papierchromatographisch analysiert, wobei die ppp(A,U)-Synthese¹ nach einer Szintillationsmessung als Anteil der Radioaktivität der Produktzone an der Gesamtradioaktivität bestimmt und in relativen Einheiten ausgedrückt wurde (Tab. 9).

Ein wichtiger grundlegender Befund ist die Tatsache, daß das Gesamtfragment (a+b+c+d) die stärkste Matrizenaktivität zeigt (relative Aktivität = 100). Mit jedem Verlust einer DNA-Region ist eine Verringerung der Dinukleotidsynthese verbunden. Dies gilt zumindest in diesem System auch allgemein für ein beliebiges Paar, das zueinander in der Hierarchie Fragment/Subfragment steht. Die

¹ppp(A,U) steht für die beiden Sequenzen pppApU und/oder pppUpA, die in einem Ansatz mit ATP und UTP theoretisch gebildet werden können, aber bei der verwendeten Analyse nicht getrennt wurden. Für das Gesamtfragment als Matrize wurde gezeigt, daß ppp(A,U) lediglich aus pppApU besteht (ohne Beleg); diese Charakterisierung ist jedoch für die Synthese an den Subfragmenten nicht wiederholt worden.

²Zwischen 5 und 12 nM DNA war eine maximale ppp(A,U)-Synthese am Gesamtfragment (a+b+c+d) beobachtet worden (Schäffner, 1984).

Tab. 9 Matrizenaktivitäten und Sequenzdaten verschiedener Regionen des Nopalindehydrogenase-Gens

Die Reaktionen zur ppp(A,U)-Synthese wurden wie im Text beschrieben mit 0,9 µg Weizenkeim RNA Polymerase II und je 200 µM ATP und [α - 32 P]UTP durchgeführt. Die eingesetzten Fragmente (vgl. Fig. 28) wurden durch folgende Restriktionsverdauungen aus den Plasmiden pld und ple (s. Material) als das angegebene Fragment (das größte als 1 bezeichnet, usw.) erzeugt und zweimal durch Elektrophorese über ein Agarosegel und Elution in eine Dialysemembran-Falle (s. Methoden) gereinigt:

(a+b+c+d) als pld/*Hind*III-2; (b+c+d) als pld/*Hind*III, *Ava*I-2; (c+d) als pld/*Hind*III, *Nci*I-1; (d) als pld/*Hind*III, *Bam*HI-3 oder ple/*Hind*III, *Bam*HI-2; (d') als ple/*Alu*I, *Ava*I-1; (d'') als ple/*Alu*I, *Hpa*II-1; (a+b+c) als pld/*Hind*III, *Bam*HI-2; (b+c) als pld/*Ava*I, *Bam*HI-3.

Bei der mit ¹ bezeichneten Versuchsreihe wurden die ppp(A,U)-Synthesen je dreimal wiederholt und diese wiederum je zweifach papierchromatographisch (Whatman 3MM/ Fließmittel III) analysiert, so daß insgesamt pro DNA-Fragment sechs Werte für die Synthese vorlagen, woraus die angegebenen relativen Werte und Standardabweichungen berechnet wurden. Im Fall von ² wurde je ein Versuch zweimal analysiert.

Zur Auswertung waren die einzelnen Chromatogramme in achtzehn 1cm-Streifen zerschnitten und die Radioaktivität durch Szintillationsmessung gezählt worden. Die in ppp(A,U) eingebaute Radioaktivität (6. bis 8. Streifen) wurde für jedes einzelne Chromatogramm als Ipm/10⁶ Ipm Gesamtradioaktivität auf dem Chromatogramm bestimmt. Der Mittelwert für die stärkste Synthese wurde als 100 relative Einheiten (15797 Ipm/10⁶ Ipm in Reihe ¹), die Ansätze mit 1 µg/ml α -Amanitin (Exp. 9, 10) als 0 relative Einheiten (3546 Ipm/10⁶ Ipm in Reihe ¹, Exp. 9) definiert.

Zur Angabe der relativen Synthese/bp (Spalte 5) wurden diese Synthesewerte (Spalte 4) durch die Länge des jeweiligen Fragments (Spalte 3) geteilt. Der Wert 100:3430 = 0,029 für das Gesamtfragment wurde willkürlich gleich 1,00 gesetzt und die Werte aller Subfragmente wurden darauf bezogen. Analog wurden die Werte für relative Synthese/TA-Sequenz (Spalte 6 aus Spalte 4 und 8) ermittelt, 100:435 = 0,229 war 1,00.

¹Erste Versuchsreihe (s.o.)

²Zweite Versuchsreihe (s.o.)

³Die Ermittlung der TA-Sequenzen ist im Text beschrieben.

⁴Diesen Angaben liegt die Annahme zugrunde, daß der nicht sequenzierte Teil (910 bp am 5'-Ende von a) 50 $\pm$ 5% A+T und 12,5 $\pm$ 1,25% TA-Sequenzen enthält.

Exp. Fragment	Länge [bp]	rel.Synth. [rel. Einh.]	Selektivität [rel. Syn. / bp] [rel. Syn. / TA-Sequ. ³]		TA-Sequenzen ³ [1/bp]	A+T-Gehalt [%]
1 (a+b+c+d)	3430	100 ± 4 ^{1,2}	= 1,00	= 1,00	12,7 ± 0,3 ⁴	52,3 ± 1,5 ⁴
2 (b+c+d)	2408	89 ± 3 ¹	1,27	1,24	12,9	53,2
3 (c+d)	1810	87 ± 4 ¹	1,65	1,66	12,7	53,6
4 (d)	1125	73 ± 4 ^{1,2}	2,23	2,03	14,0	55,4
5 (d')	868	50 ²	1,98	1,72	14,6	56,3
6 (d'')	621	41 ²	2,27	1,90	15,0	56,0
7 (a+b+c)	2305	38 ± 2 ¹	0,57	0,60	12,1 ± 0,4 ⁴	50,8 ± 2,0 ⁴
8 (b+c)	1283	24 ± 7 ¹	0,64	0,67	12,1	51,7
9 1 + α-Am.	3430	0 + 1 ¹	-	-	-	-
10 4 + α-Am.	1125	0 ²	-	-	-	-
- b	598	-	-	-	14,0	53,0
- c	685	-	-	-	10,5	50,5
- b(151-250)	100	-	-	-	15,0	62,0
- b(501-600)	100	-	-	-	20,0	62,0
- b(539-600)	62	-	-	-	26,0	67,7
- d(1901-2000)	100	-	-	-	30,0	73,0
- d(2001-2100)	100	-	-	-	26,0	60,0
- d(2301-2400)	100	-	-	-	5,0	46,0

Tab. 9 Matrizenaktivitäten und Sequenzdaten verschiedener Bereiche des Nopalindehydrogenase-Gens

Verringerung korreliert dabei nicht mit der Länge des entfernten Stücks, ist aber für eine bestimmte Region gleich und unabhängig davon, aus welchem Stammfragment sie entfernt wurde (Tab. 9 Exp. 1 vs. 2; 1 vs. 2,7; 8 vs. 2,7 oder 2,8 vs. 1,7). Umgekehrt zeigt eine Region, deren Entfernen eine starke (schwache) Einbuße der Synthese zur Folge hat eine ähnlich starke (schwache) Aktivität, wenn sie selbst als Matrize eingesetzt wird (Tab. 9 Exp. 1,7 vs. 4 oder 2,4 vs. 8).

Verschiedene Regionen des DNA-Fragments (a+b+c+d) unterscheiden sich also signifikant in ihrer Matrizenaktivität, wobei die Region d selektiv bevorzugt wird, was sich in der erhöhten Syntheserate bezogen auf die Nukleotidlänge gegenüber der am Gesamtfragment und besonders gegenüber dem Fragment (a+b+c) - um den Faktor 4 - manifestiert (Tab. 9 Exp. 1 vs. 4 vs. 7).

Die Untersuchung der ebenfalls starken pppApA-Synthese in diesem System mit [α - 32 P]ATP als einzigem Substrat ergab die gleichen Tendenzen (ohne Belege; die Fragmente (d') und (d'') wurden nicht getestet).

Insgesamt legen die gefundenen Daten eine additive Eigenschaft der Matrizenaktivität nahe, wobei auf die Region a etwa 12%, auf b 2%, auf c 16% und auf d 70% entfallen³. Eine weitere Eingrenzung innerhalb von d gelang mit den Subfragmenten (d') und (d'') nicht; die Matrizenaktivität scheint nach dem Kriterium der Selektivität in d annähernd uniform verteilt zu sein (Tab. 9 Exp. 4,5,6). Da d, d' und d'' zum 3'-Ende hin überlappen, könnten jedoch Deletionen von diesem Ende her ein anderes Bild ergeben, falls dieser Bereich von

³Für diese Angaben wurden sowohl die direkt gefundenen Synthesen (Tab. 9) als auch Differenzwerte zwischen verschiedenen Experimenten berücksichtigt.

d, der in allen drei Fragmenten enthalten ist, besonders inaktiv wäre⁴.

Die Region b enthält den Bereich um das 5'-Ende der *in vivo* gefundenen mRNA (Depicker *et al.*, 1982), zeigt aber die geringste Aktivität in der ppp(A,U)-Synthese. Damit besteht offensichtlich kein Zusammenhang der Dinukleotidsynthese der gereinigten Weizenkeim RNA Polymerase II mit der pflanzlichen *in vivo* Promotorstruktur. Dennoch wird die aktive Region d auch *in vivo* in *A. tumefaciens* transkribiert, und zwar in entgegengesetzter Richtung zur pflanzlichen Nopalindehydrogenase-mRNA, wie eine Hybridisierung von Gesamt-RNA aus dem Bakterium mit (d) zeigt (vgl. Fragment 38 in: Janssens *et al.*, 1984).

Um eine alternative Deutung der Selektivität, einen einfachen Zusammenhang mit dem A+T-Gehalt zu überprüfen, wurde dieser, im Fall von a angenähert, (etwa 910 Nukleotide am 5'-Ende von a sind nicht sequenziert; Depicker *et al.*, 1982; Bevan *et al.*, 1983) für die einzelnen Regionen angegeben. Dabei ergibt sich für d ein leicht erhöhter, für c ein leicht erniedrigter und für b ein durch-

⁴Solche Analysen waren erschwert und wurden hier nicht durchgeführt, da geeignete, aus der Sequenz des Gens aus dem Stamm T37 vorhergesagte Restriktionsstellen, bes. *RsaI* an Position 2112 (vgl. Fig. 28) im verwendeten homologen DNA-Fragment aus dem Stamm C58 fehlten. Der Vergleich mit unabhängigen, von T37 bzw. C58 abstammenden Isolaten (cg2 bzw. cg3; Zambryski *et al.*, 1982) bestätigte diese *RsaI*-Stelle im T37-Isolat, bzw. ihr Fehlen in C58 (ohne Belege). Dabei handelt es sich aber nur um geringfügige Mutationen, da eine Sequenzanalyse der ersten 330 Nukleotide am 3'-Ende von d (mit entscheidender Hilfe von Peter Heinrich) nur eine einzige, durch zweimalige Wiederholung abgesicherte Transversion eines G an Position 2438 in ein C und höchstens 4 weitere Punktmutationen ergab (ohne Beleg). Auch entsprachen alle sonstigen für die Isolierung der Fragmente verwendeten Schnittstellen der Vorhersage aus der T37-Sequenz. Somit sollten die diskutierten Aussagen, die sich auf den A+T-Gehalt oder TA-Sequenzen beziehen nicht entscheidend beeinflusst werden.

schnittlicher A+T-Gehalt im Vergleich zum Gesamtfragment (Tab. 9). Da eine ppp(A,U)-Synthese aber TA-Sequenzen erfordert (Kap. 1.1.), wurde zusätzlich die Anzahl und der Anteil dieser Zweiersequenz in den Fragmenten bestimmt⁵ (Tab. 9).

Mit Hilfe der Angabe der Selektivität als Synthese pro TA-Sequenz (Tab. 9, Spalte 6) kann man eindeutig feststellen, daß die Matrizenaktivität bei der ppp(A,U)-Synthese nicht von der Zahl der potentiell kodierenden Sequenzen abhängt, also eindeutig verschiedene TA-Paare in unterschiedlichem Ausmaß als Matrize dienen.

Da die Weizenkeim RNA Polymerase II nach Untersuchungen von Chandler und Gralla (1980) nur einen Bereich von 35-45 Nukleotiden auf der DNA bedeckt, ist das Raster über die ganzen Fragmente hinweg zu grob, um diese unterschiedliche Nutzung auf eine erhöhte Dichte an TA-Sequenzen oder einen allgemein erhöhten A+T-Gehalt der Fragmente zurückzuführen. Diese Korrelation würde der Vergleich zwischen den Experimenten 4, 5 oder 6 und 2, 3 oder 8 nahelegen, während die Gegenüberstellung von Experiment 2 und 3 mit gleichen Sequenzparametern, d.h. den A+T-Gehalt und den Gehalt an TA-Sequenzen, aber unterschiedlicher Selektivität dem widerspräche (Tab. 9). Deshalb sollte die Betrachtung kleinerer Einheiten ein differenzierteres Bild erlauben. Es bestehen deutliche Unterschiede in den Sequenzparametern von kleineren Abschnitten innerhalb eines verwendeten Fragments (Tab. 9, d(1901-2000) vs. d(2301-2400)⁶), wogegen andererseits Abschnitte aus einem schwach transkribierten Bereich vergleichbar hohe Werte wie aus einem sehr aktiven aufweisen (Tab. 9, b(501-600), b(539-600) vs. d(1901-2000), d(2001-2100)).

Die absolut höchsten Werte sowohl für den A+T-Gehalt als auch für die Dichte der TA-Sequenzen befinden sich allerdings im Abschnitt d(1901-2000), der in den aktivsten Fragmenten (d), (d') und (d'') enthalten ist (Tab. 9; Fig. 28).

⁵Dabei wurden TA-Sequenzen auf beiden DNA-Strängen gezählt, bzw. TA- und AT-Sequenzen auf einem Strang, so daß 2 von 16 möglichen Zweiersequenzen ($2/16 = 12,5\%$; vgl. Tab. 9, Spalte 7) das statistische Mittel für TA/Nukleotidlänge sind.

⁶Die Zahlen in Klammern geben die Lage des Abschnitts von Nukleotid x bis Nukleotid y des sequenzierten Bereichs (vgl. Fig. 28) innerhalb der vorangestellten Region an.

Um jedoch eine eindeutige Korrelation mit diesen Sequenzparametern oder auch komplexere Strukturerefordernisse nachzuweisen, müßte man Matrizen mit drastischeren Unterschieden in diesen Werten testen; interessant wären auch unter diesem Gesichtspunkt Deletionen am 3'-Ende von d, die Abschnitte mit außerordentlich niedrigen Sequenzparametern (Tab. 9, d(2301-2400)) entfernen würden.

Einen Zusammenhang der Matrizenaktivität mit den durch Restriktionsenzyme hervorgerufenen Enden ist im hier verwendeten System unwahrscheinlich. So könnten die signifikant verschiedenen Aktivitäten von (a+b+c) und (d) nicht durch einen etwaigen Einfluß der *Bam*HI- oder *Hind*III-Stellen erklärt werden, da beide Fragmente je ein *Bam*HI- und ein *Hind*III-Ende besitzen. Auch eine Erhöhung der Synthese durch den speziellen *Hind*III-Schnitt am 3'-Ende von (a+b+c+d), (b+c+d), (c+d) und (d) wie sie von Mosig (1988) für bestimmte *Hinf*I-Schnitte beschrieben wird, liegt hier nicht vor. Die ebenfalls überdurchschnittlich aktiven Fragmente (d') und (d'') wurden mit *Alu*I erzeugt, das zwar die gleiche Sequenz am 3'-Ende erkennt, aber im Gegensatz zu *Hind*III glatte Enden hervorruft.

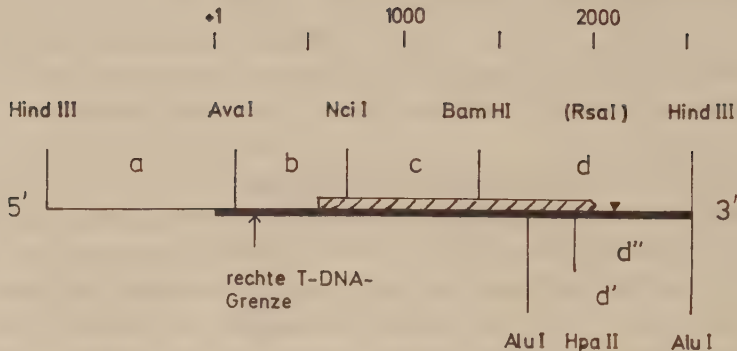


Fig. 28 Restriktionskarte des *Hind*III-Fragments 23 aus pTiC58 zur Erzeugung der verwendeten Subfragmente

Das gesamte Fragment pTiC58/*Hind*III-23 = (a+b+c+d) ist 3430 bp lang (s. Material). Die über dem Fragment angegebene Zahlenskala bezieht sich auf die Nukleotide des dick gezeichneten, sequenzier-ten Bereichs (2521 bp; Depicker *et al.*, 1982; Bevan *et al.*, 1983); diese Nomenklatur wurde im Text und in Tab. 9 verwendet. Der schraffierte Pfeil gibt Größe und Richtung der Nopalindehydrogenase-mRNA an, woraus sich die Bezeichnung des 5'- und 3'-Endes erklärt.

Die gekennzeichneten Restriktionsschnittstellen wurden zur Erzeugung der Fragmente eingesetzt (keine vollständige Karte; vgl. Sequenzdaten (s.o.); Schäffner, 1984) und definieren die Regionen a, b, c, d, d' und d''.

Die rechte T-DNA Grenze bei 244 (Zambryski *et al.*, 1980, 1982) und die im verwendeten Isolat aus pTiC58 fehlende *Rsa*I-Stelle bei 2112 (s. Methoden) sind angegeben.

2. Substrateigenschaften der Aldehyd-Nukleotidderivat-Präparationen

Die in Kap. 2.1.3.2. und 2.3.1.2. beschriebenen Beobachtungen, daß die dort verwendeten Aldehyd-Adenosinderivate und $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ auch zum Einbau von AMP in die nachgewiesenen Trinukleotide führte, können auf Verunreinigungen im $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ und/oder auf Substrateigenschaften der Derivat-Präparationen beruhen.

Hauptziel der folgenden Untersuchungen sollte es sein, in einem unabhängigen Ansatz die Substrateigenschaft der zur Affinitätsmarkierung verwendeten Präparationen zu überprüfen, um den überraschenden AMP-Einbau zu erklären.

Ein ähnliches Nukleotidderivat, das ATP-gamma-Anilidat wird von *E. coli* RNA Polymerase als Substrat genutzt (Grachev & Zaychikov, 1974). Diese und auch die im Folgenden beschriebenen Versuche können jedoch nicht eine geringe ATP-Verunreinigung der Derivate ausschließen und damit die tatsächlichen Substrateigenschaften des Derivats selbst nachweisen. Dazu wären umfangreichere Kontrollen, etwa eine unmittelbar vor dem Test erfolgende Phosphatase-Verdauung⁷ oder der Vergleich mit definierten, geringen ATP-Zusätzen nötig.

Als Testsystem wurde ein poly[d(A-T)]-abhängiger Enzym-Aktivitätstest der Weizenkeim RNA Polymerase II gewählt, da somit wie bei der Affinitätsmarkierung nur $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ und ein Adenosinderivat als Substrate an der Reaktion beteiligt waren.

pHB-ATP führte so noch zu 75% der Aktivität der Vergleichsreaktion mit ATP, während AB-ADP nur weniger als 4% erlaubte. In beiden Fällen zeigte eine Reduktion der Aldehydgruppe der Derivate keinen Einfluß auf die gefundene Aktivität (Tab. 10, Exp. 1, 3-6).

Der gleiche Wert wie mit AB-ADP wird auch mit AMP oder ohne jegliches Adenosinderivat nachgewiesen, liegt aber deutlich höher als

⁷Die in dieser Arbeit verwendeten ATP-Derivate wurden routinemäßig nach ihrer Synthese mit alkalischer Phosphatase behandelt, um un-reagiertes ATP abzubauen (s. Methoden).

Exp.	Adenosinderivat	Aktivität [rel.Einh.]
1	ATP	100
2	-	3,9
3	pHB-ATP	75,6
4	pHB-ATP _{red}	75,0
5	AB-ADP	3,6
6	AB-ADP _{red}	3,6
7	ADP	15,6
8	AMP	3,4
9	ATP, ohne Enzym	0,1

Tab. 10 poly[d(A-T)]-abhängige Enzymaktivität der Weizenkeim RNA Polymerase II in Gegenwart von [α - 32 P]UTP und Adenosin-Derivaten

1,1 μ g Weizenkeim RNA Polymerase II wurden in Gegenwart von 2 μ g poly[d(A-T)], 5 μ M [α - 32 P]UTP (5 Ci/mMol) und 400 μ M der angegebenen Adenosinderivate 15 min bei 37°C inkubiert. Ein Aliquot jeder Reaktion wurde im System Whatman 3MM/Fließmittel III chromatographiert und die Enzymaktivität als Anteil der Radioaktivität an der Auftragsstelle an der Gesamtradioaktivität des Chromatogramms bestimmt (s. Methoden).

der Blindwert mit ATP/[α - 32 P]UTP ohne Enzym (Tab. 10, Exp. 2,5,6, 8,9).

Das untersuchte ADP-Präparat scheint auch einen geringen Teil an ATP zu enthalten, da in seiner Gegenwart noch etwa 15% Aktivität gefunden werden (Tab. 10, Exp. 7).

Diese Daten ergeben somit keinerlei Hinweise auf eine Substrateigenschaft der AB-ADP-Präparation, aber weisen sie eindeutig für das pHB-ATP-Präparat nach. Möglicherweise enthält auch [α - 32 P]UTP geringe Mengen an ATP, die die geringe Synthese in den Experimenten 2, 5, 6 und 8 (Tab. 10) erlauben.

L I T E R A T U R E

- Allison, L.A., Moyle, M., Shales, M. & Ingles, J.C. (1985)
Extensive homology among the largest subunit of eukaryotic and prokaryotic RNA polymerases
Cell 42, 599-610
- Armaleo, D. (1987)
Structure and evolution of prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases: a model
J. Theor. Biol. 127, 301-314
- Armstrong, V.W., Sternbach, H. & Eckstein, F. (1976)
Affinity labeling of *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase with 5-formyl-l-(α -D-ribofuranosyl)uracil 5'-triphosphate
Biochemistry 15, 2086-2091
- Bailey, J.N., Klement, J.F. & McAllister, W.T. (1983)
Relationship between promoter structure and template specificities exhibited by the bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2814-2818
- Bateman, E. & Nicholson, B.H. (1984a)
Cross-linking of wheat germ RNA polymerase II with dithiobis (succinimidyl propionate)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 121, 680-685
- Bateman, E. & Nicholson, B.H. (1984b)
Location of DNA and nucleotide binding sites on wheat germ RNA polymerase II
Biochem. Biophys. Res. Comm. 125, 569-576
- Bensadoun, A. & Weinstein, D. (1976)
Assay of proteins in the presence of interfering materials
Anal. Biochem. 70, 241-250
- Bevan, M., Barnes, W.M. & Cilton, M.-D. (1983)
Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA
Nucleic Acids Res. 11, 369-385
- Biggs, J., Searles, L. & Greenleaf, A. (1985)
Structure of the eukaryotic transcription apparatus: features of the gene for the largest subunit of *Drosophila* RNA polymerase II
Cell 42, 611-621
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L. & Boyer, H.W. (1977)
Construction and characterization of new cloning vehicles II. A multipurpose cloning system
Gene 2, 95-113

- Brodner, O.G. & Wieland, T. (1976)
Identification of the amatoin-binding subunit of RNA polymerase B by affinity labeling experiments. Subunit B3 - the true amatoin receptor protein of multiple RNA polymerase B
Biochemistry 15, 3480-3484
- Broyles, S.S. & Moss, B. (1986)
Homology between RNA polymerases of poxviruses, prokaryotes, and eukaryotes: nucleotide sequence and transcriptional analysis of vaccinia virus genes encoding 147-kDa and 22-kDa subunits
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 3141-3145
- Buhler, J.-M., Sentenac, A. & Fromageot, P. (1974)
Isolation, structure, and general properties of yeast ribonucleic acid polymerase A (or I)
J. Biol. Chem. 249, 5963-5970
- Buhler, J.-M., Huet, J., Davies, K.E., Sentenac, A. & Fromageot, P. (1980)
Immunological studies of yeast nuclear RNA polymerases at the subunit level
J. Biol. Chem. 255, 9949-9954
- Buhler, J.-M., Riva, M., Mann, C., Thuriaux, P., Memet, S., Micouin, J.Y., Treich, I., Mariotte, S. & Sentenac, A. (1987)
Eukaryotic RNA polymerases, subunits, and genes
in: *RNA Polymerase and the Regulation of Transcription*, Reznikoff, W.S. et al., eds., Elsevier Science Publishing Co., New York, 25-36
- Bürk, R.R., Eschenbruch, M., Leuthard, P. & Steck, G. (1983)
Sensitive detection of proteins and peptides in polyacrylamide gels after formaldehyde fixation
Methods Enzymol. 91, Enzyme structure, Part I, 247-254
- Carles, C., Guegen, P. & Ribadeau-Dumas, B. (1987)
C-terminal labelling of β -casein
FEBS Lett. 212, 163-167
- Carroll, S.B. & Stollar, D. (1983)
Conservation of a DNA-binding site in the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II
J. Mol. Biol. 170, 777-790
- Chamberlin, M. & Ryan, T. (1982)
Bacteriophage DNA-dependent RNA polymerases
in: *The Enzymes*, Vol XV, Nucleic Acids, Part B, Boyer, P.D., ed., Academic Press Inc., New York, 87-108
- Chandler, D.W. & Gralla, J. (1980)
Specific binding and protection of form II SV40 deoxyribonucleic acid by RNA polymerase II from wheat germ
Biochemistry 19, 1604-1612

- Cho, J.M. & Kimball, A.P. (1982)
Probes of eukaryotic DNA-dependent RNA polymerases II
I. Binding of 9- β -D-arabinofuranosyl-6-mercaptapurine to the elongation subsite
Biochem. Pharmac. 31, 2575-2581
- Cho, J.M., Carlin, R.K., Evans, J.E. & Kimball, A.P. (1982)
Probes of eukaryotic DNA-dependent RNA polymerases II
II. Covalent binding of two purine nucleoside dialdehydes to the initiation subsite
Biochem. Pharmac. 31, 2583-2589
- Cech, C.L., Lichy, J. & McClure, W.R. (1980)
Characterization of promoter containing DNA fragments based on the abortive initiation reaction of *Escherichia coli* RNA polymerase
J. Biol. Chem. 255, 1763-1766
- Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W. & Laemmli, U.K. (1977)
Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis
J. Biol. Chem. 255, 1102-1106
- Dahmus, M.E. & Keding, C. (1983)
Transcription of adenovirus-2 major late promoter inhibited by monoclonal antibody directed against RNA polymerase II_o and II_A
J. Biol. Chem. 258, 2303-2307
- D'Alessio, J.M. (1982)
RNA sequencing
in: *Gel Electrophoresis of Nucleic Acids: A Practical Approach*, Rickwood, D. & Haynes, B.D., eds., IRL Press Ltd., Oxford, 173-197
- Davanloo, P., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. & Studier, F.W. (1984)
Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 2035-2039
- Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P. & Goodman, H.M. (1982)
Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence
J. Molec. Appl. Genet. 1, 561-573
- Dezélée, S., Wyers, F., Sentenac, A. & Fromageot, P. (1976)
Two forms of RNA polymerase B in yeast - Protoeolytic conversion *in vitro* of enzyme B₁ into B₁
Eur. J. Biochem. 65, 543-552
- Dietrich, J., Teissere, M., Job, C. & Job, D. (1985)
Poly[d(A-T)] dependent trinucleotide synthesis catalysed by wheat germ RNA polymerase II. Effects of nucleotide substrates and cordycepin triphosphate
Nucleic Acids Res. 13, 6156-6170

- Dugaiczky, A., Boyer, H.W. & Goodman, H.W. (1975)
Ligation of *Eco*RI endonuclease generated DNA fragments into linear and circular structures
J. Mol. Biol. 96, 171-184
- Dunn, J.J. & Studier, F.W. (1983)
Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements
J. Mol. Biol. 166, 477-535
- Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H. and Lang, H. (1974)
Proteinase K from *Tritirachium album* Limber
Eur. J. Biochem. 47, 91-97
- Eliot, T., Kassavetis, G.A. & Geiduschek, E.P. (1984)
The complex pattern of transcription in the segment of the bacteriophage T4 genome containing three of the head protein genes
Virology 139, 260-282
- Falco, S.C. & Rothman-Denes, L.B. (1979)
Bacteriophage N4-induced transcribing activities in *Escherichia coli*. I. Detection and characterization in cell extracts
Virology 95, 454-465
- Falco, S.C., Vander Laan, K. & Rothman-Denes, L.B. (1977)
Virion-associated RNA polymerase required for bacteriophage N4 development
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 520-523
- Falco, S.C., Zivin, R. & Rothman-Denes, L.B. (1978)
Novel template requirements for N4 virion RNA polymerase
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3220-3224
- Falco, S.C., Zehring, W & Rothman-Denes, L.B. (1980)
DNA-dependent RNA polymerase from bacteriophage N4 virions, purification and characterization
J. Biol. Chem. 255, 4339-4347
- Falkenburg, D., Dworniczak, B., Faust, D.M. & Bautz, E.K.F. (1987)
RNA polymerase II of *Drosophila*: relation of its 140kD subunit to the β subunit of *E. coli* RNA polymerase
J. Mol. Biol. 195, 929-938
- Fling, S.P. & Gregerson, D.S. (1986)
Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high molarity Tris buffer system without urea
Anal. Biochem. 155, 83-86
- Glonek, T., Kleps, R.A. & Myers, T.C. (1974)
Cyclization of the phosphate side chain of adenosine triphosphate: formation of monoadenosine 5'-trimeta-phosphate
Science 185, 352-355

- Godovikova, T.S., Grachev, M.A., Kutyavin, I.V., Tsarev, I.G., Zarytova, V.F. & Zaychikov, E.F. (1987)
Studies of the functional topography of *Escherichia coli* RNA polymerase. Affinity labeling of RNA polymerase in a promoter complex by phosphorylating derivatives of primer oligo nucleotides
Eur. J. Biochem. 166, 611-616
- Good, N.E., Winget, G.D., Winter, W., Connolly, T.N., Izawa, S. & Singh, R.M.M. (1966)
Hydrogen ion buffers for biological research
Biochemistry 5, 467-477
- Grachev, M.A. & Mustaev, A.A. (1982)
Cyclic adenosine-5'-trimetaphosphate phosphorylates a histidine residue nearby the initiating substrate binding site of *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase
FEBS Lett. 137, 89-94
- Grachev, M.A. & Zaychikov, E.F. (1974)
ATP gamma-anilidate; a substrate of DNA-dependent RNA-polymerase of *Escherichia coli*
FEBS Lett. 49, 163-166
- Grachev, M.A. & Zaychikov, E.F. (1981)
Photomodification studies of the contacts of the 5'-terminus of growing RNA with the subunits of RNA polymerase
FEBS Lett. 130, 23-26
- Grachev, M.A. & Zaychikov, E.F. (1983)
Affinity modification of template-dependent enzymes in nucleic acids biosynthesis
in: *Affinity Modification of Biopolymers*, Knorre, D.G., ed., Nauka, Siberian Division, Novosibirsk, 149-187
- Grachev, M.A., Mustaev, A.A. & Kolocheva, T.I. (1985)
Identification of a histidine residue in the active site of *Escherichia coli* RNA polymerase
Dokl. Acad. Nauk SSSR 281, 723-727
- Grachev, M.A., Hartmann, G.R., Maximova, T.G., Mustaev, A.A., Schäffner, A.R., Sieber, H. & Zaychikov, E.F. (1986a)
Highly selective affinity labelling of RNA polymerase B (II) from wheat germ
FEBS Lett. 200, 287-290
- Grachev, M.A., Lukhtanov, E.A. & Mustaev, A.A. (1986b)
Synthesis of derivatives of nucleoside 5'-mono-, di-, and triphosphates with reactive groups attached to phosphate residues
Bioorg. Khim. 12, 1079-1087

- Grachev, M.A., Zaychikov, E.F., Kut'yavin, I.V. & Tsarev, I.G. (1986c)
Affinity modification of *E. coli* RNA polymerase in a complex with a promoter by phosphorylating derivatives of primer oligonucleotides
Bioorg. Khim. 12, 1678-1681
- Grachev, M.A., Kolocheva, T.I., Lukhtanov, E.A. & Mustaev, A.A. (1987a)
Studies on the functional topography of *Escherichia coli* RNA polymerase - Highly selective affinity labelling by analogues of initiating substrates
Eur. J. Biochem. 163, 113-121
- Grachev, M.A., Lukhtanov, E.A., Mustaev, A.A., Richter, V.A., Rabinov, I.V., Skoblov, Y.S. & Abdukayumov, M.N. (1987b)
Localization of lysine residues nearby the site of initiating substrate binding of *E. coli* RNA polymerase
Bioorg. Khim. 13, 552-555
- Grachev, M.A., Zaychikov, E.F., Lukhtanov, E.A., Maximova, T.G. & Mustaev, A.A. (1987c)
Highly selective affinity labelling of T7 RNA polymerase
Bioorg. Khim. 13, 568-570
- Grachev, M.A., Zaychikov, E.F., Lukhtanov, E.A., Maximova, T.G., Mustaev, A.A., Sidelnikova, N.P. & Tsarev, J.G. (1987d)
in: Abstracts of the 18th FEBS Meeting, Lyubl'jana, Yugoslavia, p. 136
- Greenleaf, A.L. (1983)
Amanitin-resistant RNA polymerase II mutations are in the enzyme's largest subunit
J. Biol. Chem. 258, 13403-13406
- Gross, E. (1967)
The cyanogen bromide reaction
Methods Enzymol. XI, Hirs, C.H.W., ed., 238-255
- Guilfoyle, T.J., Malcolm, S. & Hagen, G. (1983)
Eukaryotic DNA-dependent RNA polymerases: structural and immunological characterization
in: *Isozymes: Current topics in biological and medical research*, Vol. 7, 241-261
- Guilfoyle, T.J., Hagen, G. & Malcolm, S. (1984)
Size heterogeneity of the largest subunit of nuclear RNA Polymerase II
J. Biol. Chem. 259, 649-653
- Gundelfinger, E.D. (1983)
Interaction of nucleic acids with the DNA-dependent RNA polymerases of *Drosophila*
FEBS Lett. 157, 133-138

- Hager, D.A. & Burgess, R.R. (1980)
Elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate, and renaturation of enzymatic activity: results with sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase, and other enzymes
Anal. Biochem. 109, 76-86
- Hahn, H. & Servos, D. (1980)
The isolation of multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase from nuclei of quiescent wheat embryos by affinity chromatography
Z. Pflanzenphysiol. 97, 43-57
- Han, K.-K., Richard, C. & Biserte, G. (1983)
Current developments in chemical cleavage of proteins
Int. J. Biochem. 15, 875-884
- Hanahan, D. (1985)
Plasmid screening at high colony density
Gene 10, 63-67
- Hansen, U.M. & McClure, W.R. (1979)
A noncyclic activity assay for the σ subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase
J. Biol. Chem. 254, 5713-5717
- Hanna M.M. & Meares, C.F. (1983a)
Synthesis of a cleavable dinucleotide photoaffinity probe of ribonucleic acid polymerase: application to trinucleotide labeling of an *Escherichia coli* transcription complex
Biochemistry 22, 3546-3551
- Hanna M.M. & Meares, C.F. (1983b)
Topography of transcription: path of the leading end of nascent RNA through the *Escherichia coli* transcription complex
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4238-4242
- Hartmann, G.R., Heinrich, P., Kollenda, M.C., Skrobranek, B., Tropschug, M. & Weiß, W. (1985)
Molecular mechanism of action of the antibiotic rifampicin
Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 24, 1009-1014
- Haynes, L.L. & Rothman-Denes, L.B. (1985)
N4 virion RNA polymerase sites of transcription initiation
Cell 41, 597-605
- Heinrich, P. (1987)
Klonierung und Sequenzierung von Rifampicin-Resistenzgenen
Dissertation, Fakultät für Pharmazie und Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München

- Hess, H.H., Lees, M.B. & Derr, J.E. (1978)
A linear Lowry-Folin assay for both water-soluble and sodium dodecyl sulfate-solubilized proteins
Anal. Biochem. 85, 295-300
- Herzfeld, F. & Kiper, M. (1976)
The reconstitution of *Anacystis nidulans* DNA-dependent RNA polymerase from its isolated subunits
Eur. J. Biochem. 62, 189-192
- Heumann, H., Meisenberger, O. & Pilz, I (1982)
Small-angle X-ray study of aggregates of DNA-dependent RNA polymerase from *Escherichia coli*
FEBS Lett. 138, 273-276
- Hinrichsen, A.I., Ortner, I.M. & Hartmann, G.R. (1985)
Synthesis of dinucleoside tetraphosphates by RNA polymerase B (II) from calf thymus
FEBS Lett. 193, 199-202
- Hodo, H.G.III & Blatti, S.P. (1977)
Purification using polyethylenimine precipitation and low molecular weight subunit analysis of calf thymus and wheat germ DNA-dependent RNA polymerase II
Biochemistry 16, 2334-2343
- Honda, A., Mizumoto, K. & Ishihama, A. (1986)
RNA polymerase of influenza virus - Dinucleotide-primed initiation of transcription at specific positions on viral RNA
J. Biol. Chem. 261, 5987-5991
- Hooykaas-Van Slogteren, G.M.S., Hooykaas, P.J.J. & Schilperoort, R.A. (1984)
Expression of Ti plasmid genes in monocotyledonous plants infected with *Agrobacterium tumefaciens*
Nature 311, 763-764
- Huet, J., Buhler, J.M., Sentenac, A. & Fromageot, P. (1975)
Dissociation of two polypeptide chains from yeast RNA polymerase A
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3034-3038
- Huet, J., Sentenac, A. & Fromageot, P. (1982a)
Spot-immunodetection of conserved determinants in eukaryotic RNA polymerases
J. Biol. Chem. 257, 2613-2618
- Huet, J., Phallente, L., Buttin, G., Sentenac, A. & Fromageot, P. (1982b)
Probing yeast RNA polymerase A subunits with monospecific antibodies
EMBO J. 1, 1193-1198

- Huet, J., Riva, M., Sentenac, A. & Fromageot, P. (1985)
Yeast RNA polymerase C and its subunits. Specific antibodies
as structural and functional probes
J. Biol. Chem. 260, 15304-15310
- Ikeda, R.A. & Richardson, C.C. (1987)
Enzymatic properties of a proteolytically nicked RNA
polymerase of bacteriophage T7
J. Biol. Chem. 262, 3790-3799
- Jacobs, E. & Clad, A. (1986)
Electroelution of fixed and stained membrane proteins from
preparative sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels into a
membrane trap
Anal. Biochem. 154, 583-589
- Janssens, A., Engler, G., Zambryski, P. & Van Montagu, M. (1984)
The nopaline C58 T-DNA region is transcribed in *Agrobacterium*
tumefaciens
Mol. Gen. Genet. 195, 341-350
- Jendrisak, J.J. & Burgess, R.R. (1975)
A new method for the large-scale purification of wheat germ
DNA-dependent RNA polymerase II
Biochemistry 14, 4639-4645
- Jendrisak, J. & Guilfoyle, T.J. (1978)
Eukaryotic RNA polymerases: comparative subunit structures,
immunological properties, and α -amanitin sensitivities of the
class II enzymes from higher plants
Biochemistry 17, 1322-1327
- Jendrisak, J.J. & Skuzeski, J. (1983)
Subunit structures differences in RNA polymerase II purified
from ungerminated versus germinated wheat embryos
Plant Physiol. 72, 1068-1074
- Johnston, D.E. & McClure, W.R. (1976)
Abortive initiation of *in vitro* RNA synthesis on bacterio
phage lambda DNA
in: *RNA Polymerase*, Losick, R. & Chamberlain, M., eds., CSHL,
Cold Spring Harbor, N.Y., 413-428
- Jonassen, H.B., LeBlanc, R.B., Meibohm, A.W. & Rogan, R.M. (1950)
Dissociation constants of polyethylenamines
J. Amer. Chem. Soc. 72, 2430-2433
- Jue, R.A. & Doolittle, R.F. (1985)
Determination of the relative positions of amino acids by
partial specific cleavages of end-labeled proteins
Biochemistry 24, 162-170
- Kessler, C., Mi, H. & Hartmann, G.R. (1982)
Competition of rifampicin with binding of substrate and RNA
to RNA polymerase
Eur. J. Biochem. 122, 515-518

- Kidd, G.H., Link, G. & Bogorad, L. (1979)
Comparison of large subunits of type II DNA-dependent RNA polymerases from higher plants
Plant Physiol. 64, 671-673
- Kiino, D.R. & Rothman-Denes, L.B. (1988)
Bacteriophage N4
in: *The bacteriophages, Vol II*, Calendar, R, ed., Plenum Press, New York, in press
- Knorre, D.G., Kurbatov, V.A. & Samukov, V.V. (1976)
General method for the synthesis of ATP gamma-derivatives
FEBS Lett. 70, 105-108
- Laemmli, U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature 227, 680-685
- Lescure, B., Williamson, V. & Sentenac, A. (1981)
Efficient and selective initiation by yeast RNA polymerase B in a dinucleotide-primed reaction
Nucleic Acids Res. 9, 31-45
- Lewis, M.K. & Burgess, R.R. (1980)
Transcription of simian virus 40 DNA by wheat germ RNA polymerase II. Priming of RNA synthesis by the 3'-hydroxyl of DNA at single strand nicks
J. Biol. Chem. 255, 4928-4936
- Lewis, M.K. & Burgess, R.R. (1982)
Eukaryotic RNA polymerases
in: *The Enzymes*, Vol. XV, Nucleic Acids, Part B, Boyer, P.D., ed., Academic Press Inc., New York, 109-153
- Link, G., Kidd, G.H., Richter, G. & Bogorad, L. (1978)
Structural relationships among the multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase II from cultured parsley cells
Eur. J. Biochem. 91, 363-368
- Linsmaier, E.M. & Skoog, F. (1965)
Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures
Physiol. Plant. 18, 100-127
- Lisitsyn, N.A., Sverdlov, E.D., Moiseyeva, E.P., Danilevskaya, O.N. & Nikivorov, V.G. (1984)
Mutation to rifampicin resistance at the beginning of the RNA polymerase β subunit in *Escherichia coli*
Mol. Gen. Genet. 196, 173-174
- Lörz, H., Baker, B. & Scell, J. (1985)
Gene transfer to cereal cells mediated by protoplast transformation
Mol. Gen. Genet. 199, 178-182

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951)
Protein measurement with the Folin phenol reagent
J. Biol. Chem. 193, 265-275
- Malygin, A.G. & Shemyakin, M.F. (1979)
Adenosine, NAD nad FAD can initiate template-dependent RNA
synthesis catalyzed by *Escherichia coli* RNA polymerase
FEBS Lett. 102, 51-54
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982)
Molecular cloning. A laboratory manual
Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Mann, A., Kessler, C., Mosig, H. & Hartmann, G.R. (1983)
On the molecular mechanism of action of rifampicin
Robert-Koch-Mitt. 6, 73-82
- Mann, C., Buhler, J.-M., Treich, I. & Sentenac, A. (1987)
RPC40, a unique gene for a subunit shared between yeast RNA
polymerases A and C
Cell 48, 627-637
- March, J. (1977)
Advanced organic chemistry - Reactions, mechanisms, and
structure
2nd Edition, McGraw-Hill, Auckland
- Martial, J. Zalvidar, J., Bull, P., Venegas, A. & Valenzuela, P.
(1975)
Inactivation of rat liver RNA polymerase I and II and yeast
RNA polymerase I by pyridoxal 5'-phosphate. Evidence for the
participation of lysyl residues at the active site
Biochemistry 14, 4907-4911
- Masters, B.S., Stohl, L.L. & Clayton, D.A. (1987)
Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those
encoded by bacteriophages T3 and T7
Cell 51, 89-99
- McClure, W.R. & Cech, C.L. (1978)
On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis
J. Biol. Chem. 253, 8949-8956
- McClure, W.R., Cech, C.L. & Johnston, D.E. (1978)
A steady state assay for the RNA polymerase initiation
reaction
J. Biol. Chem. 253, 8941-8948
- McGraw, N.J., Bailey, J.N., Cleaves, G.R., Dembinski, D.R., Gocke,
C.R., Joliffe, L.K., MacWright, R.S. & McAllister, W.T (1985)
Sequence and analysis of the gene for bacteriophage T3 RNA
polymerase
Nucleic Acids Res. 13, 6753-6766

- Merril, C.R., Goldman, D., Sedman, S.A. & Ebert, M.H. (1981)
 Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels
 shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins
Science 211, 1437-1438
- Modak, M.J. (1976)
 Observations on the pyridoxal 5'-phosphate inhibition of DNA
 polymerases
Biochemistry 15, 3620-3626
- Morris, C.E., Klement, J.F. & McAllister, W.T. (1986)
 Cloning and expression of the bacteriophage T3 RNA polymerase
 gene
Gene 41, 193-200
- Morris, C.E., McGraw, N.J., Joho, K., Brown, J.E., Klement, J.F.,
 Ling, M.L. & McAllister, W.T. (1987)
 Mechanisms of promoter recognition by the bacteriophage T3
 and T7 RNA polymerases
 in: *RNA Polymerase and the Regulation of Transcription*,
 Reznikoff, W.S. et al., eds., Elsevier Science Publishing
 Co., New York, 47-58
- Morton, R.A. & Stubbs, A.L. (1940)
 Absorption spectra of hydroxy-aldehydes, hydroxy-ketones, and
 their methyl ethers
J. Chem. Soc. 1940, 1347-1359
- Mosig, H. (1988)
 Zur abortiven Initiation und Transkription durch die gerei-
 nigte DNA-abhängige RNA Polymerase II aus Weizenkeimen
 Dissertation, Fakultät für Pharmazie und Chemie, Ludwig-
 Maximilians-Universität München
- Mosig, H., Schäffner, A.R., Sieber, H. & Hartmann, G.R. (1985)
 Primer-independent abortive initiation by wheat germ RNA
 polymerase B (II)
Eur. J. Biochem. 149, 337-343
- Narahashi, Y. (1970)
 Pronase
Methods Enzymol. XIX, Proteolytic Enzymes, 651-664
- Nath, K. & Hurwitz, J. (1974)
 Covalent attachment of ribonucleotides at 3'-hydroxyl ends of
 deoxyribonucleic acid catalyzed by deoxyribonucleic acid-
 dependent ribonucleic acid polymerase of *Escherichia coli*
J. Biol. Chem. 249, 2605-2615
- Nixon, J., Spoor, T., Evans, J. & Kimball, A. (1972)
 Affinity labeling of *Escherichia coli* B deoxyribonucleic acid
 dependent ribonucleic acid polymerase
Biochemistry 11, 4570-4572
- Nonet, M., Sweetser, D. & Young, R.A. (1987)
 Functional redundancy and structural polymorphism in the
 large subunit of RNA polymerase II
Cell 50, 909-915

- Oen, H. & Wu, C.-W. (1978)
DNA-dependent single-step addition reactions catalyzed by
Escherichia coli RNA polymerase
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1778-1782
- Ovchinnikov, Yu.A., Monastyrskaya, G.S., Gubanov, V.V., Guryev, S.O., Chertov, O.Yu., Modyanov, N.N., Grikevich, V.A., Makarova, I.A., Marchenko, T.V., Polvnikova, I.N., Lipkin, V.M. & Sverdlov, E.D. (1981)
The primary structure of *Escherichia coli* RNA polymerase. Nucleotide sequence of the *rpoB* gene and amino acid sequence of the β -subunit
Eur. J. Biochem. 116, 621-629
- Perrin, D. (1965)
Dissociation constants of organic bases in aqueous solution
International Union of Pure and Applied Chemistry
Butterworth, London
- P-L Biochemicals (1973)
Ultraviolet absorption spectra of 5'-ribonucleotides
in: *Circular No. OR-10*, Milwaukee, Wisconsin
- Randerath, K. & Randerath, E. (1967)
Thin-layer separation methods for nucleic acid derivatives
Methods Enzymol. 12A, Nucleic Acids, Part B, 323-347
- Rieger, H. (1976)
Das Tetrahydroborat-Ion
in: *Gmelin Handbuch der Anorganischen Chemie*, Ergänzungswerk zur 8. Auflage, Gmelin Institut für Anorganische Chemie, Springer Verlag, Berlin 1-45
- Riva, M., Buhler, J.-M., Sentenac, A. & Fromageot, P. (1982)
Natural variation in yeast RNA polymerase A
J. Biol. Chem. 257, 4570-4577
- Riva, M., Memet, S., Micouin, J., Huet, J., Treich, I., Dassa, J., Young, R., Buhler, J.-M., Sentenac, A. & Fromageot, P. (1986)
Isolation of structural genes for yeast RNA polymerases by immunological screening
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 1554-1558
- Riva, M., Schäffner, A.R., Sentenac, A., Hartmann, G.R., Mustaev, A.A., Zaychikov, E.F. & Grachev, M.A. (1987)
Active site labeling of the RNA polymerases A, B, and C from yeast
J. Biol. Chem. 262, 14377-14380
- Rothman-Denes, L.B. & Schito, G.C. (1974)
Novel transcribing activities in N4-infected *Escherichia coli*
Virology 60, 65-72

- Rothman-Denes, L.B., Haynes, L.L., Markiewicz, P., Glucksmann, A., Malone, C. & Chase, J. (1985)
Bacteriophage N4 virion RNA polymerase promoters
in: *Sequence specificity in transcription and translation*,
Calendar, R. & Gold, L., eds., Alan R. Liss, Inc., New York,
41-53
- Rothman-Denes, L.B., Abravaya, K., Glucksmann, A., Malone, C. & Markiewicz, P. (1987)
Bacteriophage N4-coded RNA polymerases
in: *RNA Polymerase and the Regulation of Transcription*,
Reznikoff, W.S. et al., eds., Elsevier Science Publishing
Co., New York, 37-45
- Ruet, A., Sentenac, A., Fromageot, P., Winsor, B. & Lacroute, F. (1980)
A mutation of the B220 subunit gene affects the structural
and functional properties of yeast RNA polymerase B *in vitro*
J. Biol. Chem. 255, 6450-6455
- Schäffner, A.R. (1984)
Spezifitäten der Weizenkeim RNA Polymerase II bei der aborti-
ven Initiation am Nopalinsynthase-Gen
Diplomarbeit, Fakultät für Pharmazie und Chemie, Ludwig-
Maximilians-Universität München
- Schäffner, A.R., Jorgensen, E.D., McAllister, W.T. & Hartmann, G.R. (1987)
Specific labelling of the active site of T7 RNA polymerase
Nucleic Acids Res. 15, 8773-8781
- Schleif, R.F. & Wensink, P.C. (1981)
Practical authors in molecular biology
Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin
- Schlegel, H.G. (1976)
Allgemeine Mikrobiologie
4., überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Schneider, G.J. & Haselkorn, R. (1986)
Purification and characterization of *Anabaena* RNA polymerase
in: *Abstracts of Lecture and Poster Presentations: RNA
Polymerase and the Regulation of Transcription*, 16th Steen-
bock Symposium, University of Wisconsin, Madison, USA,
P-II-41
- Schneider, G.J., Tumer, N.E., Richaud, C., Borbely, G. & Haselkorn, R. (1987)
Purification and characterization of RNA polymerase from the
cyanobacterium *Anabaena* 7120
J. Biol. Chem. 262, 14633-14639
- Schweitzer, S., Blohm, D. & Geider, K. (1980)
Expression of Ti-plasmid DNA in *E. coli*: Comparison of
homologous fragments cloned from Ti plasmids of *Agrobacterium*
strains C58 and Ach5
Plasmid 4, 196-204

- Sentenac, A. (1985)
Eukaryotic RNA polymerases
CRC Crit. Rev. Biochem. 18, 31-90
- Sentenac, A. & Hall, B. (1982)
Yeast nuclear RNA polymerases and their role in transcription
in: *The molecular biology of the the yeast Saccharomyces. Metabolism and gene expression*, Strathern, J.N. et al., eds., Cold Spring Harbor laboratory, New York, 561-606
- Shemyakin, M.F. & Malygin, A.G. (1980)
Participation of adenosine and guanosine derivative in the abortive initiation of RNA synthesis with *E. coli* RNA polymerase: The effect of Mg⁺⁺, Mn⁺⁺ and rifampicin
Mol. Biol. (Moscow) 14, 1392-1395
- Sentenac, A. & Hall, B. (1982)
Yeast nuclear RNA polymerases and their role in transcription
in: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces. Metabolism and Gene Expression*, Strathern, J.N., Jones, E.W. & Broach, J.R., eds., CSHL, Cold Spring Harbor, N.Y., 561-606
- Skiba, N.P., Efimov, V.A., Lipkin, V.M., Chakhmakhcheva, O.G. & Ovchinnikov, Yu.A. (1986)
Localization of binding sites on *E. coli* DNA-dependent RNA polymerase for photosensitive template analogues
Bioorg. Khim. 12, 1023-1029
- Smirnov, Y.V., Lipkin, V.M., Ovchinnikov, Y.A., Grachev, M.A. & Mustaev, A.A. (1981)
Affinity labeling of the binding site for the initiating substrate in *E. coli* DNA-dependent RNA polymerase by adenosine 5'-trimetaphosphate
Bioorg. Khim. 7, 1113-1116
- Smirnov, Y.V., Lipkin, V.M., Ovchinnikov, Y.A., Grachev, M.A. & Mustaev, A.A. (1984)
Affinity labeling of the binding site for the initiating substrate in *E. coli* DNA-dependent RNA polymerase by adenosine 5'-tri-metaphosphate
in: *Chemistry of Peptides and Proteins*, Vol 2, Voelter, W., Bayer, E., Ovchinnikov, Y.A., Wünsch, E., eds., Walter de Gruyter & Co., Berlin, New York, 395-402
- Smith, D.G. (1967)
Techniques in enzyme hydrolysis
Methods Enzymol. XI, Hirs, C.H.W., ed., 214-231
- Stahl, S.C. & Zinn, K. (1981)
Nucleotide sequence of the cloned gene for T7 RNA polymerase
J. Mol. Biol. 148, 481-485
- Studier, F.W. & Rosenberg, A.H. (1981)
Genetic and physical mapping of the late region of bacteriophage T7 DNA by use of cloned fragments of T7 DNA
J. Mol. Biol. 153, 503-525

- Sverdlov, E.D. & Tsarev, S.A. (1980)
E. coli RNA polymerase subunits contacting RNA 5'-terminus
 at different steps of transcription
Bioorg. Khim. 6, 1110-1113
- Sverdlov, E.D., Tsarev, S.A., Modyanov, N.N., Lipkin, V.M.,
 Grachev, M.A., Zaychikov, E.F. & Pletnev, A.G. (1978)
 Photoaffinity labeling of *E. coli* RNA polymerase with
 substrate analogs in a transcribing complex
Bioorg. Khim. 4, 1278-1280
- Sweetser, D., Nonet, M. & Young, R.A. (1987)
 Prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases have homologous
 core subunits
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1192-1196
- Szopa, J., Böcher, M. & Wagner, K.G. (1983a)
 Purification and properties of an endonuclease from nuclei of
 tobacco cell cultures
Z. Pflanzenphysiol. 109, 291-300
- Szopa, J., Szmidszinski, R. & Wagner, K.G. (1983b)
 Purification and properties of a manganese-dependent
 endonuclease from tobacco cell cultures
Z. Pflanzenphysiol. 111, 341-348
- Szopa, J. & Wagner, K.G. (1984)
 DNA-dependent RNA polymerase II from nuclei of suspension-
 cultured tobacco cells
Planta 162, 132-138
- Tabor, S. & Richardson, C.C. (1985)
 A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for
 controlled exclusive expression of specific genes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1074-1078
- Thiele, D., Hannig, E. & Leibowitz, M. (1984)
 Multiple L double-stranded RNA species of *Saccharomyces*
cerevisiae: evidence for separate encapsidation
Mol. Cell. Biol. 4, 92-100
- Thomm, M., Lindner, A.J., Hartmann, G.R. & Stetter, K.O. (1988)
 Affinity labelling of the active center of DNA-dependent RNA
 polymerases within the archaeobacterial kingdom
System. Appl. Microbiol. 477, in press
- Vaisius, A.C. & Wieland, T. (1982)
 Formation of a single phosphodiester bond by RNA polymerase B
 from calf thymus is not inhibited by α -amanitin
Biochemistry 21, 3097-3101
- Valenzuela, P., Bull, P., Zalvidar, J., Venegas, A. & Martial, J.
 (1978)
 Subunits of yeast RNA polymerase I involved in interactions
 with DNA and nucleotides
Biochem. Biophys. Res. Comm. 81, 662-666

- Venegas, A., Martial, J. & Valenzuela, P. (1973)
Active site-directed inhibition of *E. coli* DNA-dependent RNA polymerase by pyridoxal 5'-phosphate
Biochem. Biophys. Res. Comm. 55, 1053-1059
- Viera, J. & Messing, J. (1982)
The pUC-plasmids, a M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers
Gene 19, 259-268
- Weber, K. & Osborn, M. (1969)
The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
J. Biol. Chem. 244, 4406-4412
- Weeks, J.R., Coulter, D.E. & Greenleaf, A.L. (1982)
Immunological studies of RNA polymerase II using antibodies to subunits of *Drosophila* and wheat germ enzyme
J. Biol. Chem. 257, 5884-5891
- Weiss, W. (1985)
Die abortive Initiation - Ein Vergleich der RNA Polymerasen aus *Micrococcus luteus* und *Escherichia coli*
Diplomarbeit, Fakultät für Pharmazie und Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Werr, W. Frommer, W.-B., Maas, C. & Starlinger, P. (1985)
Structure of the sucrose synthase gene on chromosome 9 of *Zea mays* L.
EMBO J. 4, 1373-1380
- Wickner, S., Hurwitz, J., Nath, K. & Yarbrough, L. (1972)
DNA dependent RNA polymerase catalyzed synthesis of polyribonucleotide chains covalently linked to DNA
Biochem. Biophys. Res. Comm. 48, 619-627
- Willmitzer, L. (1979)
Demonstration of *in vitro* covalent modification of chromosomal proteins by poly(ADP) ribosylation in plant nuclei
FEBS Lett. 108, 13-16
- Willmitzer, L. & Wagner, K.G. (1981)
The isolation of nuclei from tissue-cultured plant cells
Exp. Cell Res. 135, 69-77
- Wold, F. (1981)
In vivo chemical modification of proteins - posttranslational modification
Ann. Rev. Biochem. 50, 783-814
- Yarbrough, L.R. (1982)
Utilization of primers and primer-templates by wheat germ RNA polymerase II
J. Biol. Chem. 257, 6171-6177

- Young, R.A. & Davies, R.W. (1983)
Yeast RNA polymerase II genes: Isolation with antibody probes
Science 222, 778-782
- Zambryski, P., Holsters, M., Kruger, K., Depicker, A., Schell, J.,
Van Montagu, M. & Goodman, H.M. (1980)
Tumor DNA structure in plant cells transformed by *A. tumefaciens*
Science 209, 1385-1391
- Zambryski, P., Depicker, A. Kruger, K. & Goodman, H.M. (1982)
Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: analysis of the
boundaries of T-DNA
J. Molec. Appl. Genet. 1, 361-370
- Zehring, W.A., Falco, S.C., Malone, C. & Rothman-Denes, L.B.
(1983)
Bacteriophage N4-induced transcribing activities in *E. coli*.
A third cistron required for N4 RNA polymerase II activity
Virology 126, 678-687
- Zehring, W.A. & Rothman-Denes, L.B. (1983)
Purification and characterization of coliphage N4 RNA
polymerase II activity from infected cell extracts
J. Biol. Chem. 258, 8074-8080
- Zillig, W., Schnabel, R., Gropp, F., Reiter, W.D., Stetter, K. &
Thomm, M. (1985)
The evolution of the transcription apparatus
in: Evolution of prokaryotes (Schleifer, K.H. & Stackebrandt,
E., eds., Academic Press, New York, 45-72
- Zivin, R., Zehring, W. & Rothman-Denes, L.B. (1981)
Transcriptional map of bacteriophage N4, localization and
polarity of N4 RNAs
J. Mol. Biol. 152, 335-356

LEBENS LAUF

Name	Anton Rudolf Schöffner
Geburtsdatum	20. April 1959
Geburtsort	Steinhöring
Eltern	Maria Schöffner, geb. Forster Dr. Anton Schöffner
Familienstand	Seit 28. Juni 1985 mit Gudrun Schöffner, geb. Stillner verheiratet; ein Sohn
1965 - 1969	Volksschule in Rosenheim, Reutlingen, Regensburg und Steinhöring
1969 - 1978	Gymnasium Grafing
1978	Abitur
1978 - 1984	Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München 1983 Diplomhauptprüfung 1983-1984 : Diplomarbeit am Institut für Biochemie unter Anleitung von Prof. Dr. G.R. Hartmann ("Spezifitäten der Weizenkeim RNA Polymerase II bei der abortiven Initiation am Nopalinsynthase-Gen")
Okt. 1985 - Dez. 1987	Doktorarbeit am selben Institut, ebenfalls unter Anleitung von Prof. Dr. G.R. Hartmann

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

- Mosig, H., Schäffner, A.R., Sieber, H. & Hartmann, G.R. (1985)
Primer-independent abortive initiation by wheat germ RNA
polymerase B (II)
Eur. J. Biochem. 149, 337-343
- Grachev, M.A., Hartmann, G.R., Maximova, T.G., Mustaev, A.A.,
Schäffner, A.R., Sieber, H. & Zaychikov, E.F. (1986a)
Highly selective affinity labelling of RNA polymerase B
(II) from wheat germ
FEBS Lett. 200, 287-290
- Riva, M., Schäffner, A.R., Sentenac, A., Hartmann, G.R.,
Mustaev, A.A., Zaychikov, E.F. & Grachev, M.A. (1987)
Active site labeling of the RNA polymerases A, B, and C
from yeast
J. Biol. Chem. 262, 14377-14380
- Schäffner, A.R., Jorgensen, E.D., McAllister, W.T. & Hartmann,
G.R. (1987)
Specific labelling of the active site of T7 RNA polymerase
Nucleic Acids Res. 15, 8773-8781

